

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

PAR

Jean d'AUZAC de Lamartinie

Première thèse. - Etude de quelques réactions métaboliques liées, au sein du latex d'*Hévéa brasiliensis*, à la biogenèse du caoutchouc.

Deuxième thèse. - Propositions données par la Faculté :
Sur quelques relations entre la composition, l'activité biochimique du latex et la productivité de l'*Hévéa brasiliensis*.

Soutenues le décembre 1965 devant la Commission d'examen

MM. CHOUARD	<i>Président</i>
CAMUS	} <i>Examineurs.</i>
LIORET	

11 DEC. 1965

SOCIÉTÉ D'ÉDITIONS TECHNIQUES CONTINENTALES
5, SQUARE PETRARQUE, PARIS XVI^e

1965

THÈSES

PRESENTEES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

PAR

Jean d'AUZAC de Lamartinie

Première thèse. - Etude de quelques réactions métaboliques liées, au sein du latex d'Hévéa brasiliensis, à la biogenèse du caoutchouc.

Deuxième thèse. - Propositions données par la Faculté :
Sur quelques relations entre la composition, l'activité biochimique du latex et la productivité de l'Hévéa brasiliensis.

Soutenues le décembre 1965 devant la Commission d'examen

MM. CHOUARD	Président
CAMUS	} Examineurs.
LIORÉT	



SOCIÉTÉ D'ÉDITIONS TECHNIQUES CONTINENTALES
5, SQUARE PETRARQUE, PARIS XVI^e

FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE PARIS

- PROFESSEURS -
Doyen ... M. ZAMANSKY

BRELOT	T Analyse supérieure	COUTEAUX	T Cytologie
PRENANT	T Anatomie et histologie comparée	MAY	T Zoologie
GRASSE	T Evolution des êtres organisés	CHOQUET	T Théorie des fonctions et topologie
PREVOST	T Chimie organique	FELDMANN	T Biologie végétale marine
WYART	T Minéral, & cristal.	GUINIER	T Physique des solides (Orsay)
TEISSIER	T Zoologie	JOST	T Physiologie comparée
MANGENOT	T Biologie vég. (Orsay)	FORTET	T Calcul des probabilité et physique mathématique
AUGER	T Physique quantique et relativité	SCHWARTZ	T Calcul dif. & Intégral
MONNIER	T Physiologie générale	CHOUARD	T Physiologie végétale
PIVETEAU	T Paléontologie	MALAVARD	T Aviation (technique aér.)
ROCARD	T Physique ENS	NORMANT	T Synthèse organique
CARTAN	T Mathématiques ENS	BENARD	T Chimie minérale
LAFFITTE	T Chimie générale	BUVAT	T Botanique ENS
N...	T Géométrie supérieure	DUGUE	T Statistique mathématique
COULOMB	T Physique du globe	SOULAIRAC	T Psychophysiologie
Melle COUSIN	T Biologie animale SPCN	ULRICH	T Physiologie vég. appli.
CHRETIEN	T Chimie minérale	MARECHAL	T Topologie algébrique
BOCQUET	T Zoologie	KIRRMANN	T Optique théo. & appli.
KASTLER	T Physique ENS	CHADEFAUD	T Théories chimiques
EPHRUSSI	T Génétique	Melle LE BRETON	T Botanique
RIVIERE	T Géologie SPCN & sédiment. (Orsay)	LELONG	T Physio. de la nutrition
GAUTHERET	T Biologie végétale PCB	DEVILLERS	T Appli. de l'analyse à la géométrie.
LUCAS R.	T Recherches physiques	EHRESMANN	T Anatomie & histo. compa.
THOMAS A.	T Biologie cellulaire	FRANCON	T Topologie algébrique
ARNULF	T Optique appliquée	GLANGEAUD	T Physique SPCN
MORAND	T Physique enseignement	DODEMENT	T Géogra. phys. & géol.
SOLEILLET	T Physique PCB	PISOT	T Mathématiques MGP
FORTIER	T Mécanique exp. des fluides	ROCH	T Technique math. de la physique.
DRACH	T Zoologie	SCHATZMANN	T Géologie
QUENEY	T Météo & dynamique atmos.	TERMIER	T Astrophysique
GALLIEN	T Embryologie	ZAMANSKY	T Géologie générale
EICHORN	T Botanique	LENNUIER	T Mathématiques générale
DE CUGNAC	T Biologie végétale SPCN	RIZET	T Physique MGP
Melle CAUCHOIS	T Chimie physique	ROUTHIER	T Génétique Orsay
THELLIER	T Physique du globe	Mme TONNELAT	T Géologie appliquée
L'HERITIER	T Biologie générale Orsay	DIXMIER	T Physique théorique
GRIVET	T Radioélectricité Orsay	SOUCHAY	T Mathématiques MPC
PONCIN	T mécanique générale	AIGRAIN	T Chimie générale
DU BREIL	T Arith. & théorie des nombres	BRUSSET	T Electrotechn. gén.
QUELET	T Chimie organique	M. LEVY	T Chimie systématique
CAGNIARD	T Géophysique appliquée	Mme CHAIX	T Physique théorique des hautes énergies (Orsay)
CHAMPETIER	T Chimie macromoléculaire	Mme HUREL PY	T Chimie biologique
CUVILLIER	T Micropaléontologie	PANNETIER	T Biologie végétale PCB
JUNG	T Géologie	BRUN	T Chimie générale
TRILLAT	T Microscopie et diffr. élec.	LEDERER	T Mécanique des fluides I
WIEMANN	T Chimie organ. & structure	Mme DUBREIL	T Chimie biologique (Orsay)
JACQUINOT	T Spectroscopie et physique céleste (Orsay)	Mme LELONG	T Mathématiques (agrég.)
VASSY	T Physique de l'atmosphère	BELLAIR	T Math II ENS
DESTOUCHES	T Théorie physique	COTTE	T Géologie SPCN
AMEL	T Chimie générale	DUBOIS J.E	T Physique électricité
HOCART	T Minéral. & cristal.	LAMOTTE	T Chimie organique
J.P. MATHIEU	T Physique optique	MICHEL A.	T Zoologie ENS
		OLMER	T Chimie minérale Orsay
		ROUAULT	T Energétique générale
			T Electricité (Orsay)

GAUTHIER	T Mécanique appliquée	DAUDEL	T Mécanique ondulatoire appl. à la chimie théo. & à la phy. nucléaire
BARCHEWITZ	T Chimie physique		Biologie végétale SPCN
BROSSEL	T Physique atomique	Melle FOURCROY	Mécanique analytique et méca. céleste
BUSER	T Physiologie comparée	Mme CHOQUET BRUHAT	T Physiologie générale
CAMUS	T Physio. végétale		T Microbiologie
CASTAING	T Physique II thermo (Orsay)	Melle VEIL	T Méca. phys. & expérimentale
CURIEN	T Minéral. & cristal.	LWOFF	T Métallurgie des métaux nucléaires (Orsay)
MOYSE	T Physio. végé. (Orsay)	SIESTRUNCK	T Physique PCB (Orsay)
Mme CHARNIAUX-COTTON	T Evolution des êtres organisés		T Mécanique générale
POSSOMPES	T Zoologie	LACOMBE	T Math I (Orsay)
PULLMANN	T Chimie quantitative	BROCHARD	T Méca. géné. (Orsay)
TEILLAC	T Physique nucl. et radio-activité (Orsay)	CABANNES	Géogra. physique et géo. dynamique
TONNELAT	T Bio physico chim. (Orsay)	LESIEUR	Méca. des fluides
VILLE	T Econométrie	MAZET	T Physio. animale (Orsay)
WILLEMART	T Chimie PCB	CAIRE	T Physique de l'exosphère
DODE	T Chimie (Orsay)	COMOLET	Botanique II (Orsay)
FREYMANN	T Recherches physiques	CORABOEUF	Biologie animale PCB (Chimie SPCN (Orsay))
GUINCHET	T Biolo. végé. SPCN (Orsay)	DELLOUE	T Technique mathé. de la phys. (Orsay)
ROLLET	T Chimie minérale	GORENFLOT	Antropologie
Melle JOSIEN	T Chimie SPCN	HOUILLOIN	T Botanique II (Orsay)
CHEVALLEY	T Géométrie algébrique et théorie des groupes	JULLIEN J.	T Physique ENS (Orsay)
ARNOULT	T Electronique Orsay	MALGRANGE	T Botanique (Orsay)
CHAPELLE	T Physique I (Orsay)	OLIVIER	T Mathématiques (Orsay)
DELANGE	T Mathématiques I (Orsay)	NOZERAN	T Math. ENS féminines
DENY	T Math. géné. (Orsay)	BLANC-LAPIERRE	T Astronomie (Orsay)
GERMAIN	T Mécanique théorique des fluides	CHEVAUGEON	T Méca. céleste
LUCAS	T Géologie	KAHANE	Physique SPCN
ALLARD	T Chimie physique	SAMUEL	T Physique PCB
BERTHELOT	T Physique des particules fondamentales (Orsay)	KOURGANOFF	T Géologie
BRICARD	T Météor. et physique de l'atmosphère	THIRY	T Physique nucléaire et radioactivité (Orsay)
Mme ALBE FESSARD	T Psycho physiologie	ABELES	Biologie marine Villefranche/mer
FRIEDEL	T Physique des solides (Orsay)	AMAT	T Math. MPC
M. JULIA	T Etudes des complexes moléculaires	AUBOUIN	T Géologie historique Orsay
LENDER	T Biologie animale SPCN Orsay	Mme BENOIT-GUEUTAL	T Physique MGP (Orsay)
MAGAT	T Physico chimie des radio éléments	BOUGIS	T Math. propé.
Melle QUINTIN	T Electrochimie	BRUHAT	T Physique théorique (Orsay)
MONOD	T Chimie du métabolisme	BRUNN	T Géologie SPCN
BENOIT	T Physio animale Orsay	CHABBAL	T Génétique
DE POSSEL	T Analyse numérique	DEHEUVELS	Biologie végétale PCB
CHARLOT	T Chimie analytique	D'ESPAGNAT	Physique CUS Orléans
LEMEE	T Ecologie végétale Orsay	FURON	T Pétrographie
GUERIN	T Chimie MPC Orsay	Mme GANS	T Biolo. générale
CHATELET	T Chimie PCB	GENEVES	T Analyse numérique
JEAN	T Physio nucléaire Orsay	GUILBERT	T Chimie PCB
MATTLER	T Physique SPCN	HUPE	Physique propé.
BERGERARD	T Zoologie Orsay	HOLLANDE	Géologie appliqué
BERTEIN	T Electronique Orsay	LIONS	Biologie générale
BOUSSIERES	T Radiochimie	HAITTE	Pétrographie
Mme COUTURE	T Thermo. et méca. physique	MEYER	T Méca. théorique des fluides
ELLEMBERGER	T Géologie des grandes régions du globe (Orsay)	NICOLAS	Electronique
FRANC	T Biologie animale PCB	PANIGEL	T Chimie PCB
SCHNELL	Botanique tropicale	RAVIER	Physique propé.
STLKOWSKI	T Physiologie végétale	ROSEAU	Géologie appliqué
ACHER	T Chimie biologique	ROUBINE	Biologie générale
BAUDOIN	T Biologie animale PCB	SILBER	Pétrographie
BEAUMONT	Biologie animale SPCN	UEBERSFELD	T Méca. théorique des fluides
BLAMONT	Géophysique ionosphère	YVON	Electronique
BOUREAU	T Botanique	HERVE	T Théories physiques
CURIE D.	Physique MGP	NERON	T Mathématiques
DURAND DELGA	T Géologie	Mme PECKER WIMEL	T Maths MPC (Orsay)
FREON	T Chimie organique Orsay	BALKANSKY	T Astrophysique
HELLER	T Physiologie végétale	LE CORRE	Physique MPC
TORTRAT	T Calcul des probabilités	DELCROIX	T Electricité
CAILLEUX	T Géologie SPCN	GOURDIN	T Physique théorique (Orsay)
MAGNAN	Physique électricité	LEHMANN	Physique théorique (Orsay) des hautes énergies
		NATAF	T Phys. exp. des hautes énergies
			T Physique nucléaire et radioactivité (Orsay)

ECHALIER	Biologie animale PCB	BRONSSE	Géologie Orsay
BARRAUD	Physiologie cellulaire	CAGNIAC	Physique agrégation
LIORÉ	Physiologie végé. Orsay		Orsay
DARS	Géologie structurale à géolo. appliqué	LEBERRE	Zoologie (Orsay)
CAMEFORT	T Botanique (agrégation)	SCHEFFER	Microbiologie (Orsay)
VICHNIEWSKY	T Mécanique industrielle	de GENNES	Physique des solides (Orsay)
BLAQUIERE	Electronique (Orsay)		Physique nuclé. exp. (Orsay)
ARNOUS	T Physique théorique	RIOU	Chimie biolo. Orsay
TATIBOUE	Chimie (CSU Orléans)		Physio. animale Orsay
MALLEVIN	T Math. propé. (orsay)	CLAUSER	Physique atomique Orsay
GAUDEMAR	Chimie propé.	CHEVALLIER	Physique nucléaire Orsay
PÉREZ Y JORBA	Physique exp. des Hautes Energies (Orsay)	JANCOVICI	Chimie propé. Orsay
	T Chimie (agrégation Orsay)	FALK-VAIRANT	Mathématiques Orsay
DAVID	T Mécanique théorique		Physique
BROUSSE	T Astronomie	FETIZON	Chimie S.P.C.N.
ROSCH	T Physique expérimentale	CERF	Idem
GUY	Math MPC	LURCAT	Electricité générale
LAZARD	Physique MPC	RIGAUDY	Chimie C.P.E.N.
MOREL Pierre	Programmation	SIGWALT	Biochimie
ARSAC	Chimie MPC	FOURNET	Biologie physico chimique
LEFEBVRE	Biochimie	COLLONGUES	Physiologie comparée
CHAPEVILLE	Physique CPEM	DUBERT	Génétique chimique
BENOIT	Chimie CPEM	LAVOREL	Botanique
RIO	Géologie ENS		Zoologie
JAUZEIN	BV CPEM	MOREL F.	Océanographie physique
PREVOST Geor	BA CPEM	TALBOT	Chimie organique
FAVARD P.	Chimie CPEM	Mme NOUGAREDE	Physique propédeutique
VILKAS	Astronomie	FRANCOIS	Physique générale
Melle FICINI	Physique MPC	IVANOFF	Physique propédeutique
LEQUEUX	Physique CPEM	CADIOT	Génétique
COHEN TANNODJI	*	BARUCH	
TAVERNIER	BA SPCN	NOZIERES	
Mme ROIZEN	Physiologie	BOK	
DURAND M.	BA CPEM	SLONMSKI	
PASCAUD			
Mme PETIT			

Le Secrétaire Général
R. Poulain

ETUDE DE QUELQUES REACTIONS METABOLIQUES LIEES AU SEIN DU LATEX D'HEVEA BRASILIENSIS A LA BIOGENESE DU CAOUTCHOUC.

par J. d'AUZAC

SOMMAIRE

PREMIERE PARTIE

<i>Introduction</i>	7
---------------------------	---

DEUXIEME PARTIE

<i>Historique</i>	12
I. - FONCTION LATICIFERE.....	12
A. - Généralités	12
B. - Anatomie de l'écorce	12
C. - Anatomie des laticifères.....	12
D. - Etude du latex par microscopie, constituants particuliers du latex	13
E. - Saignée des laticifères, physiologie de l'écoulement	15
II. - CARACTERISTIQUES BIOCHIMIQUES DU LATEX	17
A. - Composition.....	17
1° Les éléments minéraux	17
2° Les composés organiques	17
a) Les composés à bas poids moléculaire	17
- glucides	17
- composés azotés	17
- acides organiques	18
b) Les composés à haut poids moléculaire : les protéines	19
B. - Activités enzymatiques diverses.....	20
1° Les oxydases et les peroxydases	20
2° Les réactions de décarboxylation	21
3° Les enzymes respiratoires	22
4° Enzymes diverses	23
C. - Biosynthèse du caoutchouc	23
D. - Le développement microbien au sein du latex	24

III. - LA NOTION DE VARIABILITE EN HEVEACULTURE	26
IV. - CONCLUSION	27

TROISIEME PARTIE

<i>Matériel et techniques</i>	28
I. - MATERIEL EXPERIMENTAL	28
A. - Introduction	28
B. - Technique de prélèvement.....	29
C. - Caractéristiques particulières du latex	29
1° Le latex, suspension colloïdale	29
2° La variabilité de la composition du latex	29
a) Variabilité inter-arbre sur une parcelle homogène	31
b) Variabilité intra-arbre	31
α) Influence du cycle végétatif et de la saison	31
β) Influence de la profondeur de la saignée	33
γ) Influence de la hauteur d'encoche de saignée	33
δ) Influences indéfinies	33
D. - Méthodologie de l'expérimentation	34
II. - TECHNIQUES EXPERIMENTALES	36
A. - Introduction	36
B. - Analyse de divers constituants organiques du latex	36
1° Séparations préliminaires	36
a) Elimination de la phase caoutchouc	36
α) Coagulation formique	36
β) Coagulation trichloracétique	37
γ) Coagulation éthanol-acide formique	37
δ) Séparation par ultracentrifugation	37
b) Séparation des constituants solubles du sérum	37
α) Méthode utilisée	37
β) % de récupération et reproductibilité	37
2° Analyse quantitative et qualitative des acides	
organiques	38
a) Analyse des acides fixes	38
α) Dosage global	38
β) Séparation des acides organiques fixes sur	
gel de silice	39
γ) Séparation des acides organiques fixes sur	
échangeur d'anion Dowex 1 $\times$ 8	39
δ) Dosage colorimétrique des acides citrique	
et malique	39
ξ) Chromatographie sur papier	40
b) Analyse des acides cétoniques	41
α) Dosage colorimétrique des acides cétoniques	41
β) Séparation des 2-4-dinitrophénylhydrazones	
sur colonne de cellulose	41
γ) Chromatographie sur papier des 2-4-dinitro-	
phénylhydrazones	41

c) Analyse des acides volatils	41
α) Dosage quantitatif	41
β) Dosage qualitatif et quantitatif par séparation sur colonne de silice	42
3° Analyse quantitative et qualitative des acides aminés	43
a) Dosage global	43
b) Séparation des acides aminés en neutres, acides et basiques	43
c) Analyse qualitative par chromatographie sur papier	44
4° Analyse quantitative et qualitative des glucides	44
a) Analyse quantitative	44
b) Analyse qualitative par chromatographie sur papier	44
5° Analyses diverses	44
a) Analyse du phosphore et de ses composés	44
α) Analyse quantitative	44
β) Analyse qualitative des composés phosphorylés	44
C. - Incubation de divers composés radioactifs	45
1° Incubations de composés fixes marqués au C^{14} sur latex	45
a) Méthode d'incubation	45
b) Détermination de la radioactivité des métabolites intermédiaires	50
c) Détermination de la radioactivité du caoutchouc	51
d) Etude de la reproductibilité de l'incubation	51
2° Incubations de composés fixes marqués au C^{14} sur dialysat	53
a) Méthode d'incubation utilisée	54
α) Ultracentrifugation du latex	54
β) Conduite de la dialyse	54
γ) Incubation au manomètre de Warburg	54
δ) Traitement de l'incubat	54
b) Etude de la méthode	55
c) Etude de la reproductibilité de l'incubation	56
3° Incubation de $C^{14}O_2$ sur divers milieux	57
a) Méthode d'incubation utilisée	57
b) Etude de divers facteurs d'influence	57
4° Incubation de phosphate marqué au P^{32} sur latex	59
a) Méthode d'incubation utilisée	59
b) Etude de divers facteurs d'influence	60
c) Etude de la reproductibilité de l'incubation	61

QUATRIEME PARTIE

Résultats expérimentaux	62
I. - LE CATABOLISME GLUCIDIQUE AU SEIN DU LATEX	63
A. - Introduction	63
B. - Mise en évidence du catabolisme glucidique	63
1° Disparition des glucides "in vitro"	63
2° Incubation de glucose uniformément marqué	64

3 ^o Inhibition de la glycolyse par le FNa.....	64
a) Accumulation de 3-PGA sous l'influence de FNa	64
b) Influence du FNa sur l'apport d'énergie	66
c) Influence du FNa sur la synthèse de divers acides organiques.....	67
d) Influence du FNa sur le rendement de la biosynthèse du caoutchouc à partir de l'acétate 2-C ¹⁴	68
e) Expérience récapitulative	69
C. - Discussion	71
II. - METABOLISME RESPIRATOIRE : LA DESMOLYSE DE L'ACETATE ET LES OXYDATIONS RESPIRATOIRES	73
A. - Introduction.....	73
B. - Mise en évidence de la respiration.....	73
1 ^o La respiration sur latex	73
2 ^o La desmolyse de l'acétate sur dialysat	75
a) Influence du gaz carbonique sur la desmolyse de l'acétate	75
b) Influence de l'élimination du citrate et du malate sur l'oxydation de l'acétate	76
c) Influence du pH sur l'oxydation de l'acétate	77
d) Influence de l'apport de substrat sur l'absorption d'oxygène par les dialysats	78
3 ^o Discussion	79
C. - Action des inhibiteurs des oxydations respiratoires	79
1 ^o Le cyanure.....	79
2 ^o L'oxyde de carbone	82
3 ^o Le diéthyl-dithiocarbamate de sodium (DIECA)	84
4 ^o L'o.phénantroline et l' α - α' dipyridyl.....	86
5 ^o Expérience récapitulative.....	88
6 ^o Le 2-4-dinitrophénol (2-4-DNP).....	89
7 ^o Discussion	93
D. - Etude des voies empruntées par le métabolisme respiratoire..	94
1 ^o Etude d'ensemble	94
a) Compétition isotopique.....	95
α) Compétition par tous les acides du cycle de Krebs ..	95
β) Compétition par 3 acides particuliers en concen- tration variable.....	98
γ) Discussion	100
b) Inhibition par le fluoracétate.....	101
α) Le fluoracétate à pH 7.....	101
β) Le fluoracétate à pH 4	102
γ) Discussion.....	106
c) Inhibition par l'acide malonique	109
α) 1 ^{ère} expérimentation	109
β) 2 ^e expérimentation	109
γ) 3 ^e expérimentation	110
δ) Discussion.....	111
d) Discussion	111

2° Etude des mécanismes oxydatifs possibles	111
a) Introduction	111
b) Le cycle de Krebs	112
α) Enzyme de condensation.....	112
β) Aconitase.....	112
γ) Deshydrogénase isocitrique et décarboxylase oxalosuccinique	115
δ) La deshydrogénase de l'acide α-cétoglutarique.....	115
ξ) La succino-deshydrogénase SDH	116
ζ) La fumarase.....	117
η) La deshydrogénase malique.....	118
θ) La décarboxylase pyruvique	119
ι) Discussion	120
c) Le cycle des diacides.....	120
α) Enzyme permettant la condensation de Thunberg	122
β) Enzyme malique.....	125
γ) Discussion	126
d) Le cycle glyoxylique	126
α) Expériences préliminaires	127
β) L'isocitritase.....	127
γ) La malate synthétase.....	128
δ) Discussion	129
e) Oxydation de l'acétate via le glycolate	129
α) Oxydation directe de l'acétate en glycolate	130
β) Oxydation du glycolate en CO ₂	130
γ) Discussion	132
f) Discussion	132
3° Considérations d'ensemble.....	133
E. - Discussion	135
III. - LES REACTIONS DE CARBOXYLATION	138
A. - Généralités.....	138
B. - Carboxylation du pyruvate	138
1° Introduction	138
2° Incubation de C ¹⁴ O ₂	139
3° Incubation de pyruvate 1 ou 3 C ¹⁴	140
4° Discussion	140
C. - Synthèse de l'acide malonique	141
1° Introduction.....	141
2° Mise en évidence de l'acide malonique	141
3° Considérations sur la synthèse de l'acide malonique.....	143
4° Aperçu sur le métabolisme de l'acide malonique	145
5° Discussion	148
D. - Discussion et conclusion	148
Discussion Générale et conclusions	150
Bibliographie	155

INTRODUCTION

La deuxième guerre mondiale, en coupant certains belligérants de leurs sources normales d'approvisionnement en caoutchouc, a entraîné chez eux un développement considérable des recherches dans le domaine des caoutchoucs synthétiques en même temps que la création ou le développement, à une très grande échelle, d'une industrie du caoutchouc de synthèse. L'énorme potentiel de recherche, qui a été utilisé dans ce domaine, entraîne, dans les 15 années qui ont suivi la guerre, l'apparition sur le marché d'une multitude de caoutchoucs synthétiques. Parmi ceux-ci, certains, tels les caoutchoucs Butadiène-Styrolène, ont atteint une production du même ordre de grandeur que celle du caoutchouc naturel, tout en étant vendu à un prix inférieur à celui-ci. Il en est évidemment résulté une concurrence qui n'a cependant pas atteint son plus haut degré du fait que l'offre ne fait qu'équilibrer la demande. Les économistes tendent cependant à admettre que cette concurrence se fera, dans l'avenir, de plus en plus sévère.

Il est cependant généralement reconnu que le prix de revient des caoutchoucs synthétiques n'est susceptible maintenant que de réductions limitées, tandis qu'on est en droit d'espérer que le prix du caoutchouc naturel pourra décroître de façon plus sensible, par suite de l'augmentation remarquable de la productivité dans les plantations modernes.

Cette amélioration résulte, tant des recherches effectuées par les services techniques des grandes plantations, que de celles réalisées par les divers instituts privés travaillant sur le caoutchouc. On admet communément aujourd'hui que, durant les 40 dernières années, le rendement à l'hectare a doublé et, dans des cas plus limités, triplé voire quadruplé. Les études portant sur la sélection de clones hauts producteurs, les méthodes culturales, les tests de sélection précoce, la nutrition minérale, l'apport rationnel d'engrais et la stimulation par apport d'oligo-éléments ou d'hormones de croissance sont à la base de cette augmentation de la productivité.

A ces recherches à tendance agronomique directement productives viennent s'ajouter, surtout depuis la seconde guerre mondiale, des travaux plus fondamentaux effectués indépendamment des précédents et visant à élucider les mécanismes biochimiques par lesquels les cellules vivantes élaborent les nombreux types de molécules terpéniques. Ces recherches illustrées notamment par les travaux de BONNER et ARREGUIN (49, 17, 18) à partir de 1950 connurent des fortunes diverses. Les théories formulées à l'époque furent assez rapidement abandonnées mais elles suscitèrent cependant un grand intérêt et de nombreux travaux. Le développement de l'emploi

des molécules marquées au carbone 14, l'extension considérable de techniques analytiques nouvelles, telles la chromatographie et l'électrophorèse, permirent, après la découverte en 1956 de l'acide mévalonique par FOLKERS et coll. (64), d'élucider en moins de 4 années la chaîne de réactions conduisant à la synthèse des isoprénoides. Cette découverte a permis un développement remarquable des travaux dans les domaines de la biochimie et de l'enzymologie du latex. On est en droit d'en attendre que, par une meilleure connaissance des mécanismes liés à la biosynthèse du caoutchouc, ces travaux permettent, comme les recherches purement agronomiques, d'améliorer la productivité de l'hévéa et en conséquence sa position sur le plan économique dans sa concurrence avec le caoutchouc synthétique.



Les travaux exposés ici font partie intégrante du programme de recherche de l'Institut des Recherches sur le Caoutchouc au Vietnam (I.R.C.V.) des 4 dernières années. Durant cette période, une part de l'ensemble des résultats a été obtenue en collaboration avec M. S. PUJARNISCLE à l'I.R.C.V. et MM. P. FOURNIER et TUONG CHI CUONG à l'Institut Français du Caoutchouc (I.F.C.) et a donné lieu à diverses publications communes (65, 31, 29, 30). Une autre part, comprenant la grande majorité des résultats exposés dans ce mémoire, est le fruit de travaux strictement personnels.

Un rapide historique, constituant la 2^{ème} partie de ce mémoire, rappellera les principales acquisitions dans le domaine de l'anatomie et de la physiologie de la fonction laticifère, de la biochimie du latex et des principaux facteurs conditionnant la productivité.

La 3^{ème} partie décrira le matériel et les techniques utilisées.

Dans la 4^{ème} partie nous tenterons, dans une première étape, de mettre en évidence un certain nombre de réactions métaboliques effectives au sein du latex "in vitro" et leur relation éventuelle avec la biosynthèse du caoutchouc. C'est ainsi que seront étudiés la glycolyse, la respiration et les cycles oxydatifs, soit qu'ils interviennent dans l'apport de substrat, soit qu'ils procurent l'énergie nécessaire à la biogenèse du caoutchouc. De même les réactions de carboxylation qui apparaissent comme particulièrement intenses, seront envisagées.

On conçoit donc que l'objet du travail présenté ici implique d'étudier davantage les relations des diverses fonctions du métabolisme entre elles et surtout avec la genèse du caoutchouc, que le métabolisme en lui-même. Ce travail vise donc en fait à déceler certaines réactions métaboliques qui seraient susceptibles d'être des facteurs limitants de la production, de même que la carence en certains éléments minéraux constitue un frein pour la croissance d'un végétal quelconque. Ces résultats étant acquis, il pourra s'ensuivre des études approfondies de ces facteurs limitants.

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés à Laikhê (Sud-Viêt-nam) dans les laboratoires de l'I.R.C.V. durant une période allant de 1960 à 1964. Cette époque quelque peu troublée n'a pas été sans gêner parfois le développement des recherches. Des difficultés constantes dans le domaine de la documentation scientifique comme dans l'approvisionnement en produits chimiques et en matériel sont également intervenues. Ces raisons font qu'il n'a pas toujours été possible de conduire ces recherches de la façon la plus souhaitable.



Nous sommes très sensibles au grand honneur que nous a fait M. le Professeur CHOUARD en acceptant de présider ce jury.

Nous nous devons d'assurer M. le Professeur CAMUS de notre très grande reconnaissance, pour les critiques, les conseils et les encouragements qu'il nous a prodigués. Cette aide nous a été apportée dans des circonstances où, sans elle, il ne nous aurait pas été possible de mener à bien notre travail.

Notre reconnaissance va aussi à M. le Professeur LIORET qui, dans la phase finale, nous a fait bénéficier de son aide.

Nos remerciements s'adressent également à M. P. COMPAGNON, Inspecteur des Recherches de Production et à M. J. le BRAS, Inspecteur Général Scientifique de l'I.F.C. et de l'I.R.C.V. Ils nous ont autorisés à rassembler, sous la forme d'une thèse, des travaux constituant le programme de recherches de l'I.R.C.V. et ont su par ailleurs créer le climat propice à leur réalisation.

Nous remercions le Dr E.D.C. BAPTISTE, Vice-Président Directeur Général de l'I.R.C.V. qui a toujours fait le maximum pour éliminer les obstacles matériels de toutes sortes que nous avons rencontrés.

Notre reconnaissance va aussi à M. S. PUJARNISCLE avec qui nous avons collaboré étroitement durant plusieurs années. C'est de cette heureuse collaboration qu'est née une bonne part des méthodes, des techniques et des idées qui sont à la base des travaux réalisés à l'I.R.C.V. dans le domaine de la biochimie du latex

Nos remerciements s'adressent également à M. J-P. POLINIERE, Chef de l'Expérimentation Agronomique de l'I.R.C.V. qui nous a constamment conseillé et aidé matériellement pour la sélection du matériel végétal comme pour l'interprétation statistique des résultats.

Nous remercions aussi M. H. Van BRANDT, Chef du Service d'Analyse Minérale de l'I.R.C.V. pour les analyses qu'il a effectuées sur nos latex.

Nous nous garderons d'oublier l'ensemble du personnel vietnamien du laboratoire de biochimie de l'I.R.C.V. pour leur conscience et la qualité du

travail qu'ils ont effectué. Que tous soient remerciés ici ; nous citerons particulièrement nos plus anciens collaborateurs : MM. LE-VAN-HAY, TRAN-VAN-VAN, NGUYEN-VAN-BON, DO-KIM-CAO, LE-TAN-BINH, LE-VAN-GIAU, NGUYEN-VAN-CAN et VO-HUU-HOAI.

LISTE DES ABREVIATIONS UTILISEES DANS LE TEXTE

ADP	:	Adénosine-diphosphate
ARN	:	Acide Ribonucléique
ATP	:	Adénosime-triphosphate
BD.5 ou Bd.5	:	Bodjong Datar: Clone d'Hevea Brasiliensis
Cc	:	Caoutchouc
CDP	:	Cytidine-diphosphate
CoA	:	Coenzyme A
cpm	:	coups par minute
CTP	:	Cytidine-triphosphate
Cv	:	Coefficient de variabilité
DIECA	:	Diéthyl-dithiocarbamate de sodium
DMAPP	:	Diméthyl-Allyl-pyrophosphate
2-4-DNP	:	2-4-Dinitrophénol
2-4DNPB	:	2-4 Dinitrophenylhydrazones
DOPA	:	Dihydroxyphénylalanine
DPN		
DPNH	:	Diphosphopyridine nucléotide
DPNH ₂		
DPT	:	Diphosphate de thiamine
DRC	:	Dry Rubber Content
		(Teneur en caoutchouc du latex en %)
HMG	:	Acide β hydroxy- β - méthyl-glutarique
HS	:	Hautement significatif
IPP	:	Iso-pentyl-pyrophosphate
IR	:	Intensité respiratoire
I.R.C.V	:	Institut des Recherches sur le Caoutchouc au Vietnam
I.F.C.	:	Institut Français du Caoutchouc
m.v.	:	Matériel végétal
MVA	:	Acide mévalonique
N.R.P.R.A.	:	Natural Rubber Producer's Research Association
NS	:	Non significatif
pyr.carb.	:	Acide pyrrolidone-carboxylique
P.e.l.		Phosphore énergétique labile
P.E.P.	:	Phosphore énoyl-pyruvate
Pm	:	Phosphate minéral
3-PGA	:	3-Phosphoglycérique acide
p.p.ox.	:	Poly-phénol-oxydase
5-PP-MVA	:	5-Pyrophosphomévalonate
PR.107 ou Pr.107		Prang Besar. Clone d'Hevea Brasiliensis
S	:	Significatif
SDH	:	Succino-deshydrogenase
Tj.1 ou Tjir 1:	:	Tjirandji. Clone d'Hevea Brasiliensis
TPN-TPNH-TPNH ₂	:	Triphosphopyridine nucléotide
UDP	:	Uridine-diphosphate
UV	:	Ultra-violet
V.F.A.	:	Volatil fatty acid (Acide gras volatil)
W.4 ou Waring 4.	:	Waringiana : Clone d'Hevea Brasiliensis

DEUXIEME PARTIE : HISTORIQUE

I - FONCTION LATICIFERE

A - GENERALITES

L'Hévée brasiliensis partage avec un assez grand nombre d'espèces végétales le privilège d'être doué de la fonction laticifère. Parmi ces espèces, certaines secrètent un latex contenant des alcaloïdes, tandis que d'autres possèdent un latex plus ou moins riche en caoutchouc et en résines diverses.

Le latex des plantes à caoutchouc peut être contenu dans des cellules isolées, dans des vaisseaux laticifères inarticulés provenant de la croissance indéfinie d'une seule cellule initiale ou dans des laticifères articulés constitués par des cellules allongées disposées dans le prolongement les unes des autres et dont la paroi mitoyenne s'est résorbée petit à petit. Le représentant le plus connu de ce dernier système est l'Hévée brasiliensis.

L'Hévée brasiliensis, originaire de l'Amazonie, appartient à la famille des Euphorbiacées. Son système laticifère est localisé dans les tissus mous de toutes les parties de la plante: racines, tiges, branches, feuilles, etc... C'est cependant dans la partie libérienne de l'écorce qu'il est le plus abondant.

B - ANATOMIE DE L'ECORCE

Les vaisseaux laticifères de l'hévée sont fortement anastomosés et disposés en manteaux concentriques à partir de l'assise génératrice ou cambium. Avec les tubes criblés, les cellules libériennes et les faisceaux de rayons médullaires, ils constituent l'écorce interne tendre. Les laticifères sont de plus en plus vieux et de moins en moins nombreux et actifs lorsque l'on passe de l'écorce interne vers l'écorce externe. Cette dernière, constituée de l'intérieur vers l'extérieur par le parenchyme cortical et le liège, ne contient plus que quelques laticifères désorganisés dans la partie interne du parenchyme cortical (Fig. 1).

C - ANATOMIE DES LATICIFERES

Les vaisseaux laticifères résultent, selon BOBILIOFF (44), de la réunion de cellules laticifères dont certaines membranes se sont peu à peu résorbées. Ces travaux ont été confirmés depuis par microscopie électronique de coupes ultrafines de tissus (10, 11).

Les particules de caoutchouc sont aisément visibles au sein des laticifères et la latex apparaît enfermé dans une membrane appliquée normalement de façon étroite entre les parois cellulodiques du vaisseau (10, 11, 7). Le latex est donc incontestablement d'origine cytoplasmique et non vacuolaire.

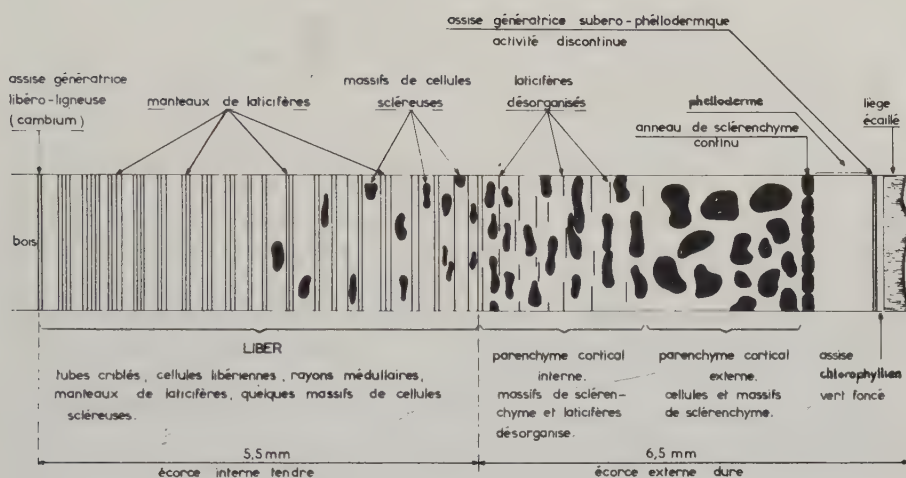


Figure 1 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'ECORCE VIERGE D'UN HEVEA DE 20 ANS (coupe transversale)

D - ETUDE DU LATEX PAR MICROSCOPIE. CONSTITUANTS PARTICULAIRES DU LATEX

Outre les particules de caoutchouc, un certain nombre de particules diverses ont été décelées, notamment noyaux, mitochondries, microsomes et réticulum endoplasmiques à double membrane contenant des protéines fibrillaires (128).

C'est en fait sur le latex tel quel ou le plus souvent fractionné par centrifugation qu'ont été effectuées la plupart des études microscopiques qui ont abouti à une connaissance, encore incomplète cependant, de la structure fine du latex et indirectement des constituants des laticifères.

FREY-WISSLING, en 1919 (70), observa à côté des particules de caoutchouc une faible proportion de particules sphériques non caoutchoutiques, teintées en jaune plus ou moins brillant et de dimension supérieure à celles des particules de caoutchouc.

HOMANS et VAN GILS (75) observèrent dans le latex frais de nouvelles particules de taille très supérieure à celle du caoutchouc. Ces particules

qu'ils appellèrent lutoïdes s'avérèrent être, en fait, des agglomérats de particules plus petites constituées d'un corps fluide limité par une membrane (156). Les inclusions particulières des lutoïdes sont animées d'un fort mouvement brownien (158) qui cesse cependant au cours du vieillissement du latex (163).

Il est possible de séparer au moins partiellement les lutoïdes des particules de latex par centrifugation à petite vitesse (75); on obtient ainsi une couche inférieure lutoïdique, (appelée souvent fraction jaune car elle rassemble entre autre les particules de FREY-WISSLING) qui représente 10 à 30 % du volume total et une fraction supérieure blanche contenant surtout le caoutchouc. Les lutoïdes ont pu être retrouvés sur des micrographies électroniques de vaisseaux laticifères (54). Notons que la stabilité colloïdale des lutoïdes est assez faible; ils coagulent avant l'ensemble du latex. Après la saignée, outre l'arrêt du mouvement Brownien, il apparaît une rupture des membranes de ces particules qui déversent ainsi leur contenu dans la phase sérum. HSIA (80) a montré que les lutoïdes contenaient des phénol-oxydases, tandis que BARNARD (34) a pu y déceler la présence de phosphatase et d'ATP-ase. Si l'on se rappelle que ces lutoïdes sont extrêmement sensibles aux variations de la pression osmotique et sont donc susceptibles de déverser aisément leur contenu dans le sérum, on voit les précautions qu'il est nécessaire de prendre dans le maniement du latex lors d'études biochimiques.

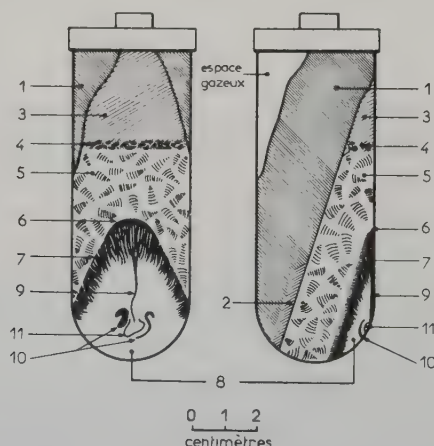


Figure 2 : ZONES OBTENUES APRES ULTRA-CENTRIFUGATION DU LATEX (selon MOIR)

- 1 - fraction blanche
- 2 - fraction blanche mais plus translucide, colorée en bleu au vert Janus.
- 3 - émulsion blanche se colorant de la même façon que 2
- 4 - zone orange; assimilable aux particules de FREY-WISSLING
- 5 - sérum relativement clair
- 6 - zone blanchâtre flottante
- 7 - zone contenant des matériaux jaunes et blanchâtres, vire au rouge par chauffage à 25-30° C en présence de vert Janus
- 8 - représente la grosse masse du culot: crème grisâtre
- 9 - coulée de matériel ressemblant à celui de la zone 7
- 10 - anneau de matériel orange
- 11 - gelée grisâtre et translucide

Les 2 types de particules considérés jusqu'à présent pourraient faire penser à une relative simplicité du latex. En fait, les premières ultracentrifugations de HURET (81) et de COOK et SEKHAR (56) n'étaient pas en désaccord avec cette notion. Ces derniers mirent en évidence 4 zones distinctes: une crème blanche contenant le caoutchouc, les particules de FREY-WISSLING, un sérum clair et un culot qu'on pouvait assimiler grossièrement aux lutoïdes. Cependant en perfectionnant les techniques d'ultracentrifugation et en utilisant des colorants, MOIR (117) distingua 11 zones de centrifugation visibles à l'œil nu (Fig. 2). SOUTHORN (164) analysa par microscopie à contraste de phases les constituants particuliers des 11 zones de MOIR et put mettre en évidence 8 types différents de particules.

Par ailleurs, les chercheurs de la Natural Rubber Producer's Research Association, N.R.P.R.A. (129) ont pu retrouver dans le latex toutes les particules précédemment mises en évidence dans des coupes de laticifères par microscopie électronique:

- 1) des particules de caoutchouc
- 2) des particules sphériques, de 1 à 3 microns de diamètre entourées d'une double membrane et contenant dans certains cas des microfibrilles de structure hélicoïdale et de nature protéique
- 3) des particules de taille similaire contenant de petites inclusions sphériques
- 4) des noyaux
- 5) des mitochondries.

A ces particules mises en évidence par microscopie électronique, il faut ajouter les ribosomes décelés après ultracentrifugation (127).

Les particules à double membrane, très sensibles aux variations de la pression osmotique, peuvent être assimilées aux lutoïdes; elles constituent la majorité des particules non caoutchouc.

Les particules contenant les inclusions sphériques peuvent être assimilées aux particules de FREY-WISSLING.

Remarquons enfin que les noyaux et les mitochondries sont plus rares dans le latex que dans les laticifères. Il s'ensuit que, si le latex représente qualitativement le contenu du laticifère, on ne peut dire qu'il lui est parfaitement identique quantitativement.

E - SAIGNEE DES LATICIFERES - PHYSIOLOGIE DE L'ECOULEMENT

Tandis que le système laticifère du *PARTHENIUM ARGENTATUM* ou du *KOK-SAGHYZ* (Composées) implique un traitement destructif de la plante entière pour en extraire le latex, il suffit, pour les arbres à caoutchouc de la famille de l'hévéa, d'effectuer une incision des laticifères de l'écorce pour récolter facilement une fraction du latex qu'ils contiennent.

Des mesures toutes récentes (43) ont montré que la pression d'origine osmotique régnant à l'intérieur des laticifères de l'Hévéa *brasiliensis* est de l'ordre de 14 atmosphères. La saignée, entraînant le sectionnement des

laticifères, transforme ce système clos en un système ouvert au niveau de l'incision; il s'ensuit un écoulement du latex sous l'effet de la pression interne. Etant donné l'anatomie du système laticifère de l'hévéa constitué, rappelons-le, par des vaisseaux articulés et fortement anastomosés, la rupture d'équilibre se propage de proche en proche jusqu'à des zones de plus en plus éloignées de l'incision et le latex est drainé sur une surface relativement importante constituant "l'aire drainée" (Fig. 3). L'écoulement du latex, rapide au moment de l'incision, décroît petit à petit par suite, d'une part de la chute de pression qu'a entraînée la saignée et, d'autre part, des pertes de charges tout au long des laticifères dues à la viscosité du latex. Il n'est pas interdit de penser par ailleurs que la réaction de dilution intervenant par suite de la saignée (54) peut entraîner le gonflement, l'éclatement ou la coagulation des lutoïdes très sensibles aux variations de la pression osmotique.

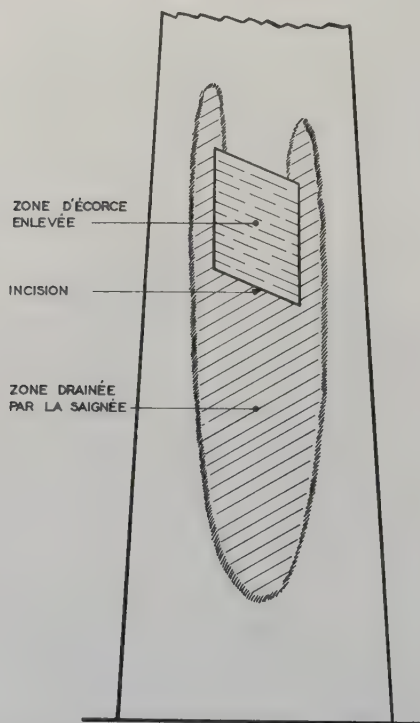


Figure 3 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'ECORCE DRAINEE PAR LA SAIGNEE, LA CIRCONFERENCE DE L'ARBRE AYANT ETE DEVELOPPEE (d'après FREY-WISSLING)

Enfin, lorsque le flot de latex est considérablement ralenti, le latex stationnant plus longtemps sur l'encoche (en couche mince) aura tendance à se concentrer par évaporation. Cette dernière cause, en même temps que celles énoncées précédemment, concourent à l'obturation progressive des laticifères au niveau de l'incision et à l'arrêt de l'écoulement du latex.

II - CARACTERISTIQUES BIOCHIMIQUES DU LATEX FRAIS

A - COMPOSITION

1 - Les éléments minéraux :

La teneur en éléments minéraux du latex est susceptible de variations importantes. On admet aujourd'hui que les valeurs données dans le tableau (140) et découlant des travaux de BEAUFILS (37, 38) constituent des valeurs "normales" au moins dans la péninsule indochinoise.

Tableau 1: VALEURS "NORMALES" DES ELEMENTS MINERAUX DU LATEX

N (1)	P (1)	K (1)	Ca (1)	Mg (1)	Rb (2)	Mn (2)	Fe (2)	Cu (2)
0,26	0,05	0,17	0,003	0,05	7,0	0,1	1,0	2,0
(1) en % du latex frais								
(2) en mg % g du latex frais								

2 - Les composés organiques

a) Composés à bas poids moléculaire

α) Glucides

Le québrachitol (monométhyl 1-inositol) est le glucide le plus anciennement connu dans le latex. Des analyses chromatographiques de BOLLES-JONES (48), d'AUZAC et PUJARNISCLE (27), LOWE (112) ont mis par ailleurs en évidence le m-inositol, le l-inositol, le saccharose, le glucose, le fructose. Des traces d'un poly-saccharide et de quelques pentoses ont été observées dans certains cas (27) sans qu'il soit possible de les identifier. R.H. SMITH (162) a pu, par ailleurs, déceler du galactose associé aux phospholipides. Le saccharose et ses constituants, le glucose et le fructose, sont présents en quantités susceptibles de varier sous des influences diverses (clone, saison, stimulation, etc...) (28). Leur somme exprimée en glucose peut atteindre, dans les cas extrêmes, 1 % du latex.

β) Composés azotés

La plupart des acides aminés classiques sont présents à l'état libre dans le latex, c'est ce qui résulte de travaux de DRAKE (60), d'AUZAC et PUJARNISCLE (87, 89, 92) et NG TET SOEI (175)

La teneur moyenne en acides aminés est de l'ordre de 2 à 3 mmol. % de sérum.

Notons que le taux d'acides aminés du latex paraît lié au clone (95) et est susceptible de variations sous l'influence de stimulation par hormone ou par sulfate de cuivre (90).

Les composés azotés soufrés du latex à bas poids moléculaire ont été particulièrement étudiés par Mac MULLEN (122). Il indiqua qu'au moins

93 % des groupes -SH du latex sont sous la forme de glutathion et de cystéine, dans le rapport moléculaire de 1,6, le rapport des formes réduites et oxydées est de l'ordre de 1 à 10. BARNES et coll. (35) ont trouvé, sur latex frais, des valeurs de ce rapport inférieures à l'unité et ils ont montré qu'il était fortement influencé par la stimulation à l'acide 2-4-dichlorophénoxyacétique. Travaillant sur des latex frais (20), nous avons personnellement trouvé des valeurs de l'ordre de 0,9 méq. de R-SH et de 0,3 méq. de R-SS-R % g de latex.

Tableau 2: ACIDES AMINES LIBRES DU LATEX (89)

Acides aminés neutres		Acides aminés acides	
Sérine	++	Cystine-Cystéine	+
Glycine	++	Acide aspartique	++
Thréonine	+	Acide glutamique	+++
Alanine	+++	Acides aminés basiques	
Proline	+		
Ac. γ - aminobutyrique	+++	X ₁	+++
Tyrosine	+	Ornithine	++
Valine	+	Lysine	++
Tryptophane	+	X ₂ (dérivé guanidique)	++
Leucine	+	Histidine	+
Isoleucine	+	Arginine	+
Phénylalanine	+	X ₃	+
Ces acides aminés ont été mis en évidence par chromatographie après séparation sur échangeur d'ions en différentes classes en partant d'un sérum trichloracétique.			
Le nombre de croix donne une approximation des quantités respectives de chacun des composés à l'intérieur d'une catégorie.			

Un certain nombre de bases azotées ont été isolées du latex par ALTMAN; ce sont notamment la choline, la colamine, la trigonelline et la stachydrine (6) (7) (8). Les dernières peuvent provenir de dégradations diverses, tandis qu'il a été montré par SMITH (162), de façon indiscutable, que la choline et la colamine (éthanolamine) provenaient de l'hydrolyse des phospholipides.

γ) Acides organiques

PHILPOTT et SEKHAR (138) ont montré, après entraînement à la vapeur et séparation sur colonne de silice, que les acides gras volatils (V.F.A.) du latex sont constitués d'un mélange d'acides formique, acétique et propionique, l'acide acétique étant prépondérant. Ils montrèrent également que les V.F.A. augmentaient considérablement en même temps que se développait la flore microbienne du latex. Comme il est pratiquement impossible d'obtenir un latex rigoureusement stérile, on ne peut savoir dans quelle mesure ces acides préexistent naturellement au sein du latex. Travaillant sur des latex récoltés de façon relativement stérile, nous avons dosé, de façon régulière, une quantité d'acides volatils correspondant à 0,05 méq.% g et dont plus de la moitié était constituée par l'acide acétique (20). Etant

donné le rôle central de l'acide acétique dans le métabolisme, on est en droit de penser qu'il existe naturellement au sein du latex, mais il faut admettre que sa teneur à l'équilibre est très faible.

D'AUZAC et PUJARNISCLE (88) ont montré que les acides citrique et malique constituent 90 % environ des acides organiques fixes. On y trouve également les acides succinique, lactique, glycolique et pyrrolidone-carboxylique.

Il faut noter que le taux des acides organiques fixes ou volatils du latex est sujet à des variations notables, sous des influences très diverses, telles que la saison (93), le clone (95), la stimulation (96) etc..

b) Composés à haut poids moléculaire: Les protéines

Les protéines du latex frais représentent environ 1 % en poids du latex; 1/5ème de ces protéines est fixé énergiquement à la surface des particules de caoutchouc, les 2/3 sont en solution dans la phase sérum, tandis que le reste est associé à la fraction sédimentable du latex et essentiellement aux lutoïdes (15). Dès 1927, BISHOP (41) a mis en évidence 3 fractions protéiniques dans le latex frais (A, B et C). Ces résultats furent confirmés par KEMP et STRAITIFF (103). Cependant l'électrophorèse permit rapidement de déceler une complexité bien supérieure. ROE et EWART trouvèrent ainsi 7 protéines distinctes (151). ARCHER et SEKHAR (16) reprirent ces travaux à la fois sur un sérum obtenu après congélation du latex (sérum F) et sur un sérum d'ultracentrifugation (sérum C); leurs résultats étaient en bon accord avec ceux de ROE. Il apparut qu'à pH 8,6 2 protéines étaient chargées positivement tandis que les 5 autres étaient chargées négativement. Par la suite ARCHER et COCKBAIN (14) mirent en évidence une alpha-globuline, qui est l'une des 2 protéines quantitativement les plus importantes du latex, ARCHER (12), travaillant cette fois sur des extraits aqueux de la fraction sédimentable, isola une protéine cristallisée à laquelle il donna le nom d'hévéine. Cette protéine présente la particularité d'être soluble dans l'eau bouillante, de posséder un poids moléculaire faible (de l'ordre de 10.000) et une teneur en soufre très élevée (5 %).

MOIR et TATA (118), travaillant également sur les protéines extraites de la fraction sédimentable, mirent en évidence par électrophorèse sur papier 8 bandes correspondant à des fractions protéiniques distinctes et ils montrèrent des différences sensibles dans l'intensité de ces bandes en fonction de la provenance clonale de latex utilisé, KARUNAKARAN et coll. (100) utilisant les protéines de la fraction sédimentable purent séparer sur colonne de cellulose une fraction protéinique aisément cristallisable constituée essentiellement d'hévéine.

L'alpha-globuline et l'hévéine sont en fait les 2 protéines quantitativement les plus importantes du latex; toutefois des travaux récents (155) utilisant l'électrophorèse sur gel d'amidon ont permis de déceler 22 constituants dont 5 cationiques et 17 anioniques. La complexité du latex apparaît ainsi pleinement.

A côté des protéines normales, Mac MULLEN (127) (15) a pu extraire d'un sérum d'ultracentrifugation des ribonucléoprotéines, qui, après purification,

contenaient environ 70 % d'acide nucléique et 30 % de protéine. L'hydrolyse acide et alcaline a permis de détecter la guanine, la cytosine et l'uracile. Des pyrophosphonucléotides ont été également extraits du sérum et analysés par purification sur Celite, chromatographie sur papier et électrophorèse (123) (cf Tableau 3)

Tableau 3: PYROPHOSPHONUCLEOTIDES DU SERUM DE LATEX (122)

	micro M./litre de M.S.	micro M./litre Sérum
ADP : Adénosine-diphosphate	0,074	5,2
CDP : Cytidine-diphosphate	0,039	2,8
UDP : Uridine-diphosphate	0,030	2,1
ATP : Adénosine-triphosphate	0,015	1,0
CTP : Cytidine-triphosphate	0,048	3,4

Travaillant ensuite sur latex, sur sérum ou sur les fractions sédimentables, Mac MULLEN (124) a pu mettre en évidence des ribosomes contenant 25 % d'acide ribonucléique (ARN) et il montra également que ces ribosomes étaient étroitement associés avec des particules ultramicroscopiques de cis-poly-isoprène. Cette association étroite l'amena à formuler l'hypothèse selon laquelle les poly-nucléotides pouvaient jouer le rôle de "template" dans la synthèse du cis-poly-isoprène à partir de l'iso-pentényl-pyrophosphate (125). Des considérations ultérieures (126) tendent également à montrer que l'ARN constituerait une part importante du système permettant la polycondensation de l'iso-pentényl-pyrophosphate.

B - ACTIVITES ENZYMATIQUES DIVERSES

Nous examinerons dans ce paragraphe divers systèmes enzymatiques du latex à l'exclusion de ceux intervenant directement dans la biosynthèse du caoutchouc qui seront l'objet d'un paragraphe particulier.

1 - Les oxydases et peroxydases

On doit à de HAAN-HOMANS (74) les premiers travaux sur les oxydases et peroxydases du latex. Cet auteur conclut à la présence d'oxydase, de peroxydase, de tyrosinase et de catalase, tous ces systèmes enzymatiques étant, selon lui, hormis la catalase, accompagnés d'inhibiteurs.

Van den TEMPEL (174), travaillant sur un latex frais, a montré que durant les 3 premières heures suivant la saignée, l'absorption d'oxygène est des plus réduites (de l'ordre de 0,4 à 3 mmol. d'oxygène par litre de sérum et par heure); cependant, par suite du développement microbien, cette absorption augmente considérablement dans les heures qui suivent.

HSIA (80) a montré clairement que l'absorption d'oxygène du latex pouvait être imputable à 3 causes distinctes: des réactions chimiques, l'activité bactérienne et des réactions enzymatiques. Il a constaté également que l'absorption d'oxygène d'origine enzymatique est localisée quasi exclusivement dans la fraction sédimentable du latex et probablement dans

les lutoïdes. L'absorption d'oxygène est maximale pour pH 6 - 6,5 dans un tampon phosphate; elle est très réduite à pH 4 comme à pH 9; au delà de pH 10, elle augmente rapidement, mais n'est plus d'origine enzymatique. HSIA a mis en évidence l'activité oxydasique de ce système vis-à-vis de divers mono-phénols (dont la tyrosine), comme vis-à-vis de plusieurs poly-phénols (dont la dihydroxyphénylalanine (DOPA). Le système (poly) phénol-oxydasique est lié à l'élément cuivre et inhibé par le cyanure, le sulfure d'hydrogène, la thiourée et les réducteurs. HSIA montra que la puissante inhibition naturelle de ces systèmes dans le latex complet est due aux composés sulfurés éliminables par dialyse.

La DOPA-oxydase est précipitable par l'acétone à 30 % à partir d'un sérum extrait de la fraction sédimentable; son pH optimum est compris entre 6 et 6,5. Elle serait liée à la coagulation du latex comme à sa coloration en présence d'air (154).

HSIA put également mettre en évidence une certaine activité peroxydasique en utilisant la purpurogalline; toutefois cette activité, à la différence du système (poly) phénol-oxydasique, n'est pas limitée à la fraction sédimentable.

Une certaine activité des enzymes susceptibles d'oxyder le glucose et l'acide ascorbique a pu être décelée dans la fraction sédimentable après dialyse; elle est relativement faible et masquée par l'activité des systèmes (poly) phénol-oxydasiques.

2 - Les réactions de décarboxylation

Indépendamment du CO_2 d'origine microbienne, Van den TEMPEL (174) a montré que le latex est susceptible de dégager 50 mmoles de CO_2 par litre de sérum et par heure. Cet auteur a constaté que ce dégagement est inhibé par N_3Na , à un degré moindre par FNa et qu'il est également considérablement réduit par les savons anioniques. Van den TEMPEL conclut de son expérimentation que le CO_2 provenait de décarboxylations se produisant à l'interface des particules de caoutchouc.

D'autres expérimentateurs (153) montrèrent que la libération de CO_2 était favorisée par l'anaérobiose et qu'elle était maximum à 30°C et à pH 5,6 (tampon phosphate). Elle est considérablement exacerbée par l'addition de pyruvate, de DOPA, d'acide α -cétoglutarique, de succinate, de fumarate, etc... Elle est également stimulée par les ions Mg et Mn et inhibée par la phloridzine, N_3Na , FNa , etc...

La *décarboxylase pyruvique* est apparue très active dans le latex et le sérum (153); elle nécessite d'être activée par la cocarboxylase et les ions Mg; elle est inhibée par FNa , la semicarbazide, la phénylhydrazine... Elle a pu être séparée du sérum par ultracentrifugation à 100.000 G pendant 45 minutes; ce serait donc une protéine soluble à haut poids moléculaire (155).

Une très forte activité de la *décarboxylase alphacétoglutarique* a également été décelée dans le latex et le sérum. La cocarboxylase et les ions Mg sont nécessaires à son fonctionnement et elle est inhibée par les mêmes inhibiteurs que la décarboxylase pyruvique (153).

La 3-4-dihydroxyphénylalanine décarboxylase a été décelée par son activité dans le latex, le sérum et surtout la fraction sédimentable; elle est normalement fortement inhibée par les mêmes agents naturels que les (poly) phénol-oxydases. C'est une enzyme cuprique, inhibée par FNa, les mononitrophénols, la semicarbazide, etc... (153) (154).

3 - Les enzymes respiratoires

A ce jour, ces enzymes n'ont pas été étudiées de façon intensive dans le latex. Nous rappellerons seulement les travaux de Van den TEMPEL (174), lequel a mis en évidence des quotients respiratoires de l'ordre de 10 sur latex frais (fig 4). Une telle valeur est évidemment incompatible avec l'oxydation d'un quelconque substrat organique et il en conclut à un découplage de l'absorption d'oxygène et du dégagement de CO_2 . Il constata que l'apport de glucose ou d'acétate n'avait pratiquement aucun effet sur la respiration (Tableau 4), tandis que HSIA (80) a mis en évidence, en utilisant un dialysat des enzymes extraites de la fraction sédimentable, une augmentation assez réduite de l'absorption d'oxygène, sous l'influence d'un apport de glucose (Fig. 5).

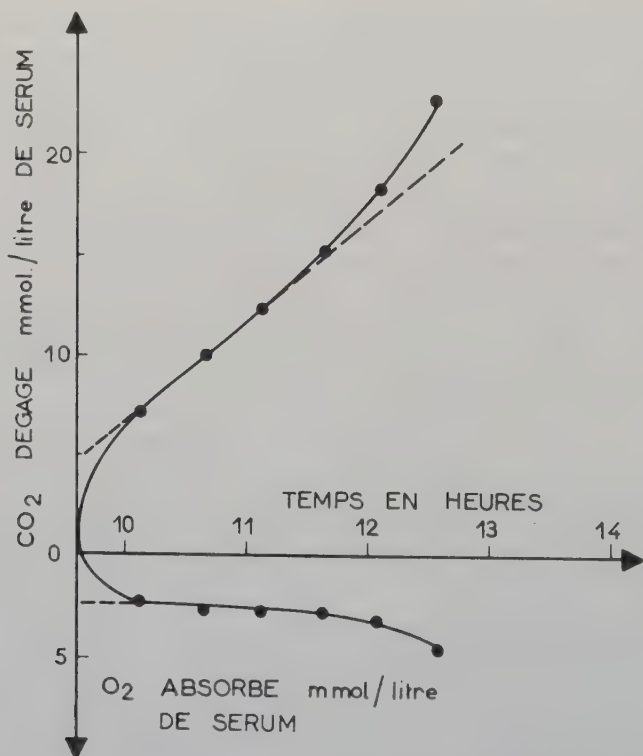


Figure 4: COURBE TYPIQUE D'ABSORPTION D'OXYGENE ET DEGAGEMENT DE CO_2 SELON VAN DEN TEMPEL

La disproportion entre le dégagement de CO_2 et l'absorption d' O_2 , conduisant à des quotients respiratoires inhabituels, apparaît nettement sur cette figure.

Tableau 4: INFLUENCE DE L'APPORT DE GLUCOSE ET D'ACETATE SUR L'ABSORPTION D'OXYGENE ET LE DEGAGEMENT DE GAZ CARBONIQUE, d'après Van den TEMPEL (174)

Substrat apporté	Variation % du témoin	
	CO ₂ dégagé	O ₂ absorbé
Glucose 1 % du latex	0	0
Acétate de Na 50 mM/ litre de sérum	- 5	- 10

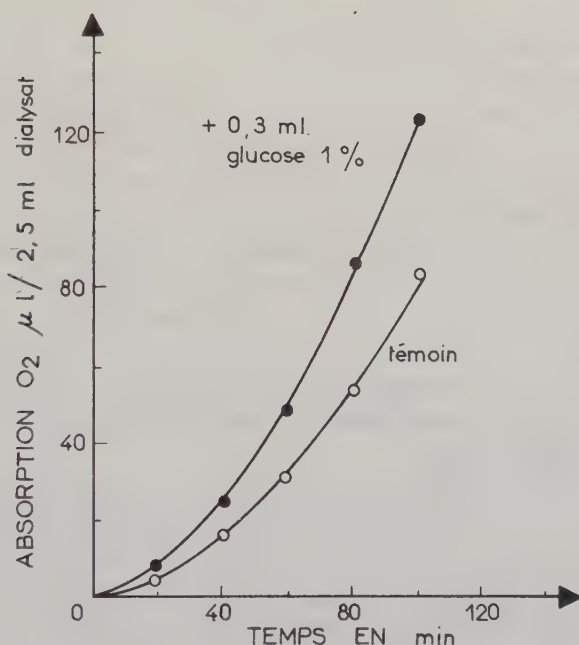


Figure 5 : OXYDATION DU GLUCOSE PAR LA FRACTION SEDIMENTABLE DIALYSEE d'après HSIA (80)

Sur un dialysat, l'apport de glucose, augmente sensiblement l'absorption d'O₂.

4 - Enzymes diverses

L'aldosase susceptible de cliver le fructose-1-6-diphosphate en D-glycéraldéhyde-3-P et en dihydroxyacétone phosphate a été mise en évidence dans la fraction sérum (72).

Signalons que, dans le même travail, le coenzyme-A a été décelée dans le latex frais comme dans des extraits de sérum.

C - BIOSYNTHESE DU CAOUTCHOUC

Deux bibliographies générales récentes sur la biogenèse du caoutchouc, l'une rédigée par FOURNIER et TUONG CHI CUONG (66), l'autre par

WHITBY (191) fontexcellentment le point de toutes les hypothèses comme de tous les travaux qui ont conduit au schéma, couramment admis aujourd'hui, de la biogenèse des isoprénoïdes en général et du cis-polyisoprène en particulier. Nous nous contenterons donc ici de donner le schéma de ce mécanisme (fig. 6).

D - LE DEVELOPPEMENT MICROBIEN AU SEIN DU LATEX

Le latex est un milieu biologique complet et de ce fait parfaitement propice au développement de très nombreux micro-organismes. D.H. TAYSUM (172 - 170) a montré que cette prolifération microbienne était susceptible d'atteindre également l'intérieur des vaisseaux laticifères et de s'y développer, au moins sur une dizaine de mm. TAYSUM (169) a également montré, à l'échelle expérimentale, que des traitements par des rayons U.V., des bactéricides et des antibiotiques étaient susceptibles d'augmenter considérablement l'écoulement du latex comme son D.R.C. Il en a déduit que les micro-organismes pouvaient entraîner des micro-coagulations du latex au sein des laticifères et donc freiner l'écoulement du latex et la production.

Rappelons, par ailleurs, que d'une façon générale il semble que les arbres à forte production (qu'elle soit naturelle ou qu'elle soit due à un traitement stimulant) possèdent un latex plus infecté et plus propice aux infections, car plus riche en glucides, phosphates, acides aminés, etc... (84, 28, 38, 26, 21, 90, 85).

Quoi qu'il en soit, le développement microbien au sein du latex "in vitro" doit être pris en considération afin d'éviter qu'il n'interfère lors d'études sur le métabolisme.



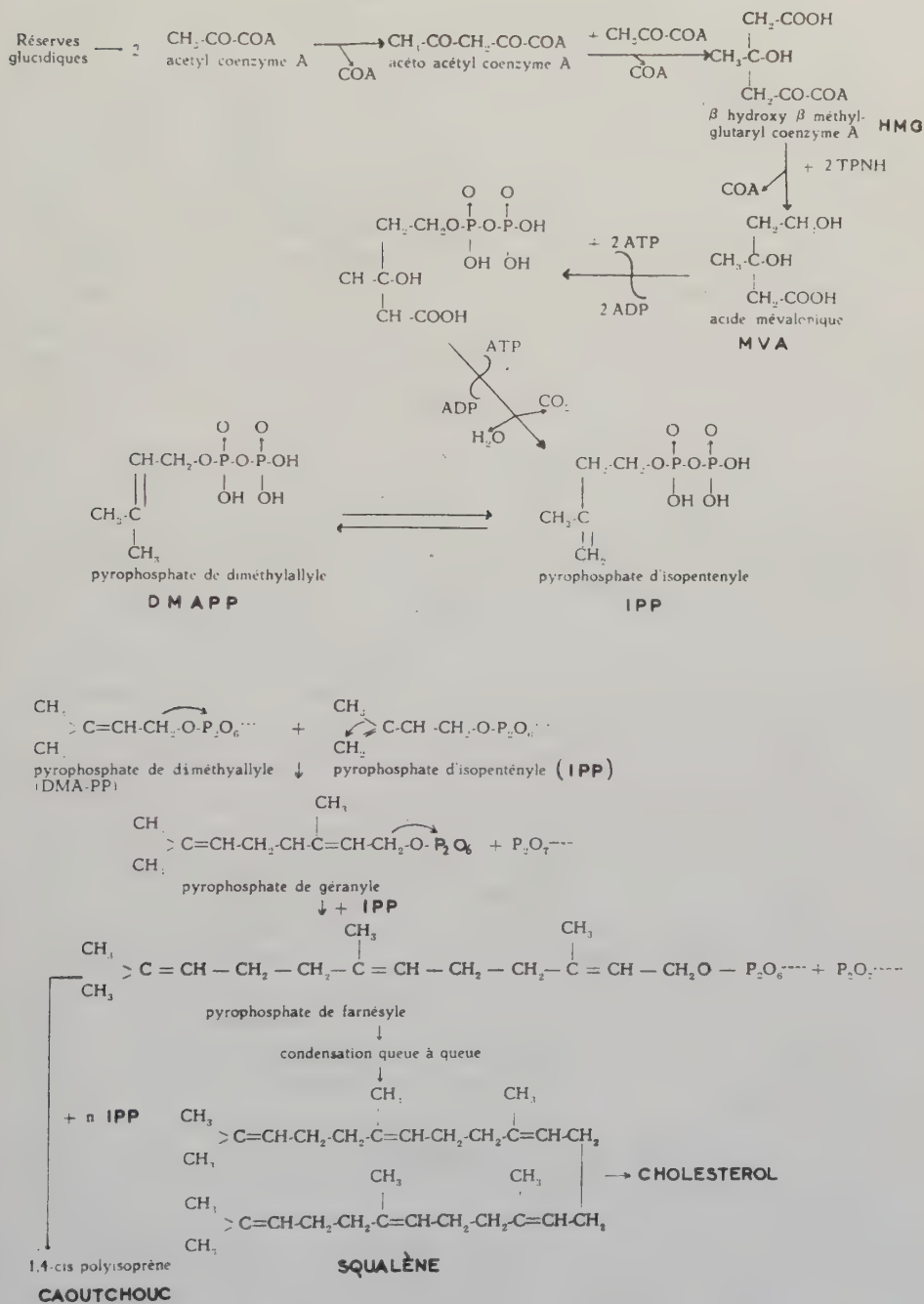


Figure 6 : SCHEMA DE LA BIOGENESE DES ISOPRENOIDES

III - LA NOTION DE VARIABILITE EN HEVEACULTURE

Il est connu depuis longtemps (192) combien peut être variable la production individuelle de seedlings ou même de greffés végétant sur une parcelle homogène. Il a été possible, au moins dans certains cas, de relier la productivité à la composition du latex. Or il est apparu, tout au long de l'étude sur les caractéristiques biochimiques du latex, que ces caractères étaient susceptibles de variations importantes sous des influences très diverses; rappelons: l'origine génétique, l'âge des arbres, la saison, les conditions climatiques, le sol, les traitements agissant sur la productivité, etc... Certains de ces facteurs ont été étudiés par RESING dans une thèse consacrée à "la variabilité du latex d'hévéa" (147). Cette variabilité propre à l'hévéaculture a des incidences dans plusieurs domaines et tout d'abord dans celui de la productivité.

Le fait que sur une parcelle clonale, en principe homogène, 20 % des arbres produisent plus de 3 tonnes de caoutchouc par hectare et par an, tandis qu'une même proportion ne conduit qu'à environ 1 tonne par hectare et par an (86) (91) incite évidemment à se rendre maître d'une telle variabilité ou tout au moins à trouver des critères permettant de sélectionner, avant la mise en exploitation, les arbres les plus hauts producteurs.

Mis à part le domaine de la productivité, cette variabilité n'est pas sans incidences sur la qualité du produit fini, qu'il s'agisse du latex centrifugé ou du caoutchouc en feuille.

Un grand nombre de travaux ont montré l'influence de la composition du latex frais sur la qualité du centrifugé et notamment sur sa stabilité colloïdale qui influence grandement son utilisation technologique. C'est ainsi qu'une teneur élevée en Mg intervient directement sur la stabilité en tant que cation divalent (147) (22) (116) (139). Des teneurs élevées en magnésium, phosphore, glucides et acides aminés interviennent également sur la stabilité colloïdale (21) (113), en favorisant le développement microbien susceptible de libérer des acides gras volatils à bas poids moléculaire (112). Tous ces facteurs sont susceptibles d'être modifiés par une stimulation hormonale de la production. L'influence du phosphore lipidique a également été reliée à la stabilité colloïdale des particules de caoutchouc (147) (26) (22).

Dans le domaine de la technologie du caoutchouc, il est apparu également une variabilité importante des propriétés des vulcanisats. Depuis les travaux de de VRIES en 1917 (185) il est admis que les constituants azotés du latex interviennent directement dans la vulcanisation du caoutchouc et consécutivement sur ses propriétés technologiques. Ainsi, ALTMAN a mis clairement en évidence le rôle des bases azotées en tant qu'accélérateurs de vulcanisation (8) et celui de certains acides aminés comme anti-oxygènes (9). BOCQUET (45), par son étude systématique des facteurs de la variabilité, a ouvert la voie à la spécification du caoutchouc d'après ses qualités intrinsèques permettant ainsi une certaine réduction de la variabilité technologique.

La notion de variabilité est donc apparue très rapidement tant dans l'hévéaculture que dans la technologie du caoutchouc. Cette variabilité a suscité un grand nombre de travaux car elle est un des principaux désavantages du caoutchouc naturel vis-à-vis du synthétique dans le domaine technologique et on conçoit qu'on ait toujours cherché à la réduire. On verra plus loin que la variabilité des caractères biochimiques du latex implique un grand nombre de précautions dans toute expérimentation, qu'elle soit de nature biochimique ou même agronomique et technologique.



IV - CONCLUSION

Cet historique très sommaire des travaux ayant trait à la fonction laticifère et à la biochimie du latex a pu montrer la très grande complexité de tout ce qui touche au latex; une telle complexité est d'ailleurs le propre de tous les milieux biologique et on ne saurait réellement s'en étonner.

En conclusion, le latex, qui représente sur le plan biochimique un bon échantillonnage du contenu des laticifères, peut être considéré comme un milieu de choix pour l'étude d'un certain nombre de facteurs liés à la biogenèse du caoutchouc pourvu qu'on l'utilise avec les précautions nécessaires, et que l'on tienne compte notamment des nombreux facteurs qui influent sur sa composition et ses propriétés.



TROISIEME PARTIE : MATERIEL et TECHNIQUES

I - MATERIEL EXPERIMENTAL

A - INTRODUCTION

D'une façon générale, toutes les études biochimiques utilisant un organe doué d'une fonction quelconque se heurtent au fait qu'il est le plus souvent indispensable d'extraire l'organe de l'ensemble auquel il participe et de l'utiliser "in vitro". Les études portant sur la biochimie de l'hévéa n'échappent pas à cette contingence. Il serait évidemment idéal de pouvoir travailler sur des laticifères au sein du liber: cependant une méthode permettant l'injection de divers substrats directement dans ces vaisseaux est pratiquement inconcevable. Il se trouve fort heureusement, comme nous l'avons vu dans l'historique, que le latex récolté par l'incision des laticifères contient qualitativement, sinon quantitativement, tous les constituants du laticifère intact. Dans leurs travaux, TEAS et BANDURSKI (173) (33), PARK et BONNER (134), KEKWICK et coll (102), ainsi qu'ARCHER et coll. (13) incubant de l'acétate, du MVA, et de l'IPP marqués au C^{14} dans du latex frais, obtinrent du caoutchouc radioactif, justifiant ainsi pleinement l'emploi du latex comme milieu enzymatique.

Il est donc de même justifié d'utiliser, comme nous l'avons fait tout au long de ce travail, le latex frais afin de tenter d'y décerner un certain nombre de réactions métaboliques liées à la biogenèse du caoutchouc.

Dans cette optique visant en fait à définir quelques relations d'activité et non à étudier en eux-mêmes certains mécanismes, nous avons cherché à utiliser au maximum le latex frais dans toute son intégrité afin d'obtenir une image de l'activité de divers métabolismes telle qu'elle existe réellement dans les conditions d'équilibre prévalant au sein de ce latex, et non, pas telle qu'elle pourrait exister au sein de particules ou de systèmes enzymatiques isolés. Afin d'illustrer cette conception, nous rappellerons simplement les travaux de HSIA (80); celui-ci montra que l'activité des poly-phénol-oxydases est en général faible sur un latex complet, parce que ces enzymes, normalement localisées dans des particules sédimentables, se trouvent inhibées au sein du latex par des composés à groupe -SH présents dans le sérum. En l'occurrence, il nous importerait plus de connaître l'activité relative des poly-phénol-oxydases dans un latex donné que leur activité absolue après séparation de la fraction particulaire qui les contient.

A part un certain nombre d'expériences visant à étudier la respiration, laquelle comme nous l'avons vu semble assez réduite dans le latex complet, celui-ci a été utilisé dans la plus grande partie des cas. Nous préciserons maintenant les techniques de prélèvement qui permettent d'éviter ou de réduire les difficultés propres à l'emploi du latex, nous donnerons quelques exemples permettant de définir sa variabilité et enfin nous décrirons la méthodologie que nous avons utilisée et qui tient compte de ces diverses contingences.

B - TECHNIQUE DE PRELEVEMENT

La nécessité de conserver au latex toute son activité enzymatique et d'éviter un développement microbien appréciable a conduit à définir une méthode particulière.

L'ensemble de ce protocole a été décrit plus en détails précédemment (31). La figure 7 illustre clairement le processus employé: désinfection du panneau de saignée, ouverture d'une nouvelle encoche, utilisation d'instruments et récipients stériles, saignée effectuée sous toile plastique, récolte du latex dans la glace, etc...

L'influence de l'infection n'a sans doute pas été autant étudiée qu'il eût été souhaitable, par suite d'un manque de moyens. Quelques expériences ont cependant été effectuées (31). Toutefois il ressort de l'avis d'un spécialiste (171) que les précautions prises, avant, pendant et après la saignée, nous mettent à l'abri, durant les 3 heures d'incubation, de phénomènes importants dus à l'activité microbienne.

C - CARACTERISTIQUES PARTICULIERES DU LATEX

Le latex frais possède dans 2 domaines différents des caractéristiques particulières dont il faut tenir compte car elles impliquent des précautions spéciales lors de son utilisation.

1 - Le latex, suspension colloïdale

Le latex est une suspension colloïdale de particules (caoutchoutiques et autres) dans un sérum aqueux.

- La stabilité colloïdale du latex frais non préservé est assez limitée; il n'est pas rare de voir certains latex coaguler dès les toutes premières heures qui suivent la saignée.
- La déstabilisation du latex est surtout sensible lorsque celui-ci est soumis à une agitation mécanique, ce qui est le cas dans les mesures de respiration au manomètre Warburg. Il est dans ce cas nécessaire d'ajouter au latex 0,1 % d'un tensio-actif non-ionique tel que l'Emulgane 0 (dérivé polyoxy-éthylé de l'acide oléique).
- La viscosité relativement élevée du latex frais n'est pas, par ailleurs, à priori favorable aux échanges gazeux dans les mesures de respiration et il importe également d'en tenir compte.

2 - La variabilité de la composition du latex

Nous avons déjà signalé que la composition du latex tant sur le plan minéral que sur le plan organique est sujette à des variations importantes sous des influences très diverses. Il est bien évident qu'une telle variabilité dans la composition doit entraîner des variations dans les activités enzymatiques. Il importe donc de garder présent à l'esprit cette variabilité comme d'en situer ses limites. Nous ne parlerons pas ici de l'influence sur la composition de facteurs aisément contrôlables tels l'origine génétique, l'apport d'engrais, la stimulation ou les traitements divers. Par contre, nous tenterons de préciser la variabilité inter-arbres d'une parcelle homogène et la variabilité intra-arbre sous certaines influences.

SCHEMA DU MODE DE SAIGNEE UTILISE POUR LA
RECOLTE DU LATEX DESTINE AUX INCUBATIONS DE
PROMOTEUR MARQUE

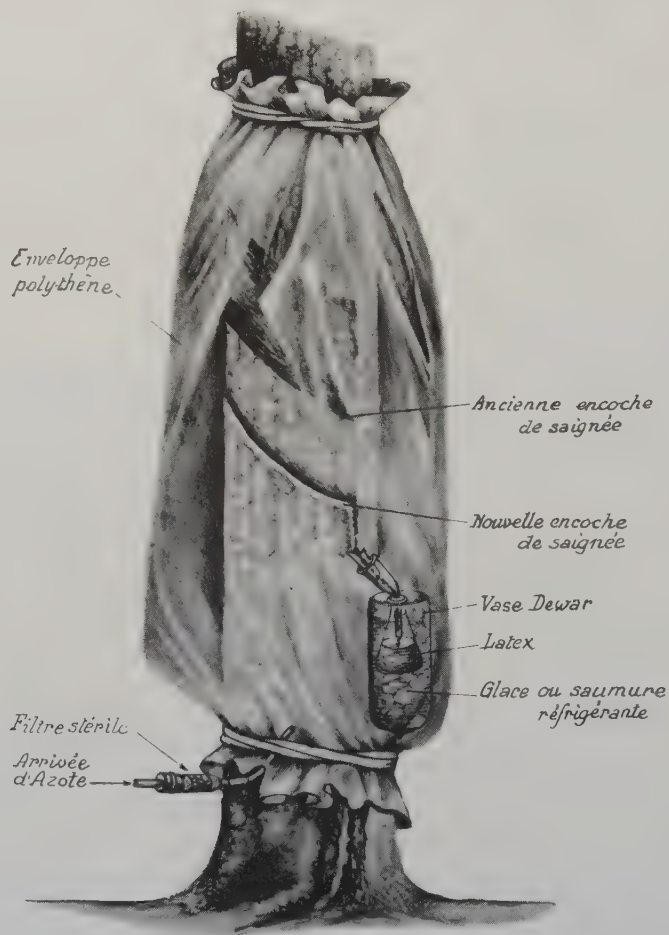


Figure 7 : SCHEMA DU MODE DE SAIGNEE UTILISE POUR LA
RECOLTE DU LATEX DESTINE AUX INCUBATIONS DE
PROMOTEUR MARQUE

a) Variabilité inter-arbres sur une parcelle homogène

Sur les plans de la production et de la teneur en éléments minéraux des feuilles et du latex, J-P. POLINIERE a fort bien montré ce que pouvait être la variabilité inter-arbres sur des parcelles homogènes (141). Pour ce faire, 8 clones d'un même champ comparatif ont été utilisés après qu'on ait éliminé les arbres non représentatifs (origine génétique douteuse, maladie, accidents de végétation, etc...); 30 arbres par clone ont alors été pris au hasard et leurs caractères analysés arbre par arbre. On a enfin déterminé la moyenne des coefficients de variabilité (Cv) pour les éléments considérés des 8 clones étudiés. (Tableau 5).

Tableau 5: COEFFICIENT DE VARIABILITE DE LA PRODUCTION, DE L'EXTRAIT SEC ET DES CONSTITUANTS MINERAUX DE 30 LATEX REPRESENTATIFS D'UNE PARCELLE (141)

Cv. en %			
Production : 47 %	N : 8 %	K : 11 %	Cu : 42 %
Extrait sec : 9 %	P : 13 %	Mg : 21 %	

Il apparait donc une variabilité de l'ordre de 50 % pour la production d'arbres représentatifs d'une parcelle monoclonale; la variabilité du taux de matière sèche est de l'ordre de 10 %, tandis que celle des éléments minéraux est comprise entre 8 et 42 %.

Ces chiffres illustrent clairement la variabilité à laquelle on est en droit de s'attendre dans le domaine biochimique. Il est heureusement possible de réduire notablement cette variabilité en sélectionnant avec beaucoup de soin le matériel végétal; on pourra utiliser à cette fin des critères anatomiques (croissance, épaisseur d'écorce) et des critères physiologiques (production, sécheresse sur l'encoche, stabilité ou instabilité du latex); il en résultera la sélection d'un nombre plus limité d'arbres représentatifs, à un niveau élevé, des caractéristiques moyennes du matériel considéré.

b) Variabilité intra-arbre

Un certain nombre de facteurs dont plusieurs sont parfaitement indéfinis conditionnent la variabilité intra-arbre. Comme dans le cas précédent, afin de définir la variabilité, nous utiliserons, comme critères, la production, la teneur en caoutchouc et la composition organo-minérale.

α) Influence du cycle végétatif et de la saison

C'est l'influence la plus évidente et il en a été largement question dans la partie historique. Elle a cependant été envisagée plus particulièrement sous l'angle organo-minéral dans un travail antérieur de d'AUZAC et PUJARNISCLE (25) (fig 8)

Les variations de la production, du D.R.C. et du phosphore total étaient déjà connues. On remarquera celle du phosphore minéral étroitement liée à celle du phosphore total, l'augmentation des glucides et des acides aminés tout au long du cycle végétatif (c'est-à-dire d'une refoliation à la

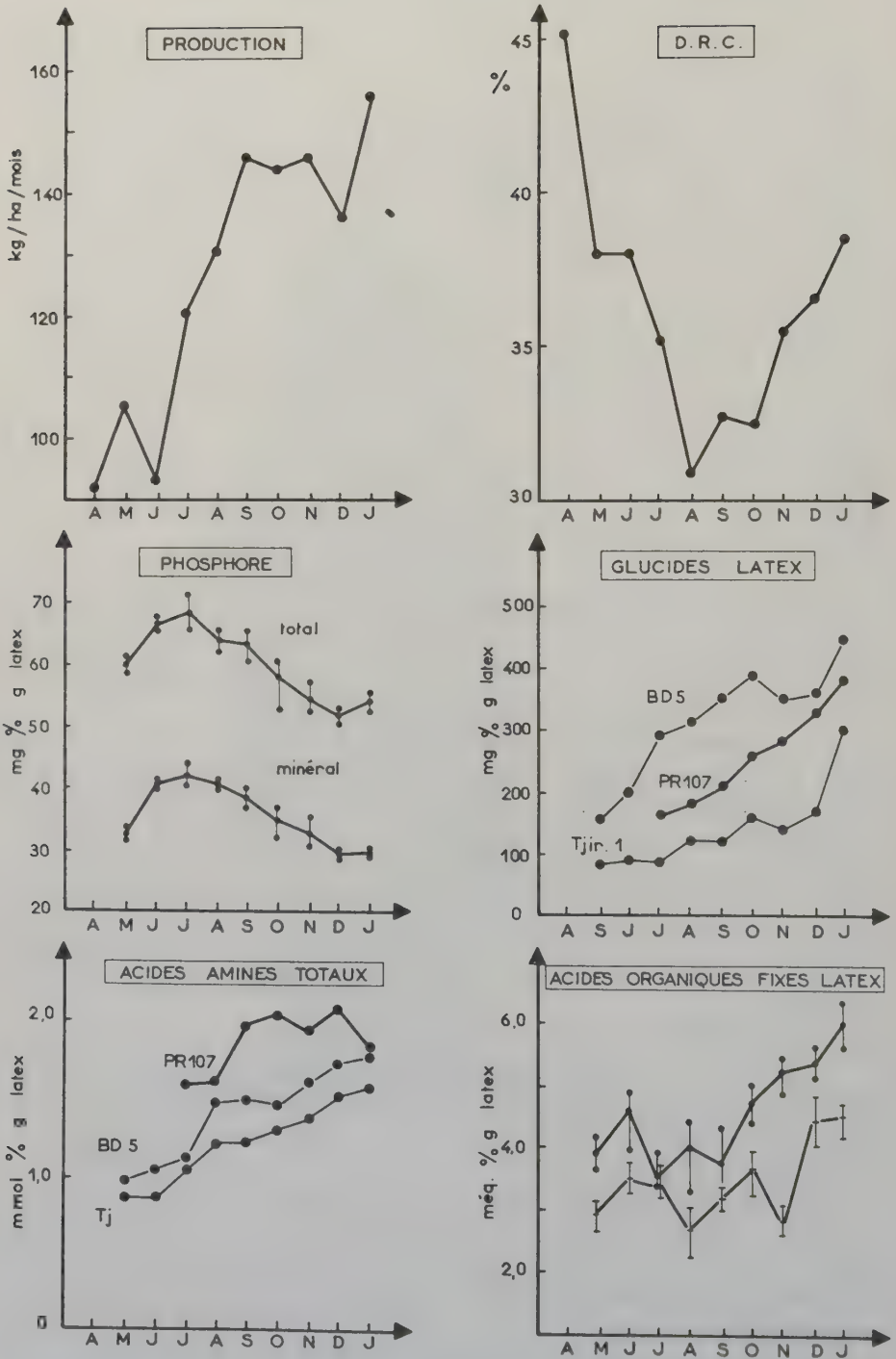


Figure 8 : VARIATION DES DIVERS CRITERES DURANT LE CYCLE VEGETATIF DE L'HEVEA

défoliation suivante) et les variations des acides organiques qui sont apparemment anarchiques.

Toutes ces variations reflètent une liaison étroite entre le métabolisme et les facteurs climatiques qui commandent le cycle végétatif.

β) Influence de la profondeur de la saignée

Nous avons vu précédemment que les laticifères les plus jeunes et les plus actifs étaient cantonnés dans l'écorce interne; il s'ensuit qu'une saignée superficielle n'intéressera guère que les vaisseaux laticifères les plus vieux et déjà plus ou moins désorganisés.

Il est connu que la profondeur de l'encoche de saignée influait effectivement sur la composition organo-minérale du latex (83); le DRC, le taux de glucides et de magnésium notamment sont affectés.

γ) Influence de la hauteur d'encoche de saignée

Il est maintenant bien connu que la hauteur de l'encoche de saignée par rapport au sol entraîne des différences considérables dans le domaine de la teneur en caoutchouc et en éléments minéraux du latex. Nous renverrons simplement aux travaux de BEAUFILS (82) qui, travaillant sur 8 clones à 4 périodes différentes, a pu mettre en évidence des différences hautement significatives pour la teneur en caoutchouc, N, P, K, Mg, Cu du latex.

Sur le plan organique, nous avons pu également déceler des écarts significatifs entre latex d'encoche haute ou basse dans le taux de glucides et de certaines catégories d'acides aminés (94).

δ) Influences indéfinies

A côté des facteurs précédents qui sont connus, il existe des facteurs divers qui induisent pour un même arbre, d'une saignée à l'autre, une variabilité relativement importante. En collaboration avec S. PUJARNISCLE, nous avons été amenés à chiffrer cette variabilité et pour cela nous avons analysé la variation de certains constituants du latex d'une saignée à l'autre.

Dans une première expérience, nous avons utilisé le latex d'un Tjir.1 saigné 6 fois de suite par un même saigneur, selon le rythme normal de saignée; dans une seconde expérience, un Waring 4 a été saigné 12 fois de suite.

Les résultats de diverses analyses et les coefficients de variabilité des résultats sont donnés dans le tableau 6.

Tableau 6 : VARIABILITE DE DIVERSES CARACTERISTIQUES DU LATEX D'UNE SAIGNEE A L'AUTRE SUR UN MEME LATEX

Expérience		Produc. g/a/s.	D.R.C.	Mg	Pt	Pm	Acides aminés	Acides organ.	Gluci- des
1 Tj.1	Moyenne :	103	38,4	22,6	68,2	42,8	-	-	-
	Cv % $\pm$:	17,4	7,1	9,0	14,2	20,7			
2 War.4	Moyenne :	90	37,5	62,5	52,5	21,7	1,78	7,18	291
	Cv % $\pm$:	15,7	11,4	15,6	18,4	35,9	23,6	15,3	26,6

- Production en g de caoutchouc par arbre et par saignée.
- D.R.C. % du latex.
- Mg, Pt, Pm en mg % g de latex
- Acides aminés en mmol. % g de latex
- Acides organiques en méq. % g de latex
- Glucides en mg de glucose % g de latex

L'examen de ce tableau fait apparaître des coefficients de variabilité pouvant atteindre 35 % et compris le plus souvent entre 10 et 25 %.

Les variations de la composition minérale ainsi mises en évidence, sous diverses influences, impliquent évidemment des variations importantes des différentes activités enzymatiques.

D - METHODOLOGIE DE L'EXPERIMENTATION

Il serait évidemment souhaitable d'utiliser un seul latex représentatif et de l'étudier dans le détail. En fait les considérations précédentes sur la variabilité montrent que vouloir utiliser un latex typique est illusoire ; en effet, on ne sait comment le définir. Il serait ensuite rigoureusement impossible de conserver un stock de ce latex durant les 12 mois nécessaires au minimum à l'étude envisagée. Cette impossibilité, conduirait donc à saigner l'arbre choisi 1 jour sur 3, selon l'alternance normale ; l'exposé précédent montre que, par suite de la variation saisonnière, de la baisse régulière de la hauteur d'encoche et de facteurs indéterminés, on aurait en fait analysé une somme de latex différents. La seule possibilité subsistant après ces considérations consiste à mener une expérimentation précise sur des fractions aliquotes d'un latex quelconque soigneusement homogénéisé, puis à répéter cette expérimentation, d'une part, sur des latex d'origines clonales différentes et, d'autre part, dans la mesure du possible, à une autre période du cycle végétatif. Cette méthodologie a été utilisée tout au long de la 4ème partie de ce mémoire. Nos expériences ont été réparties sur un certain nombre d'arbres de 4 clones différents dont la liste et un numéro de code sont donnés dans le tableau 7. On retrouvera ce numéro de code dans les expériences décrites plus loin.



Le matériel végétal ainsi que la méthodologie de l'expérimentation étant ainsi soigneusement définis au mieux des contingences diverses,

nous préciserons dans la partie suivante les techniques expérimentales utilisées.

Tableau 7: MATERIEL VEGETAL UTILISE POUR LES DIVERSES EXPERIENCES DE LA 3ème ET DE LA 4ème PARTIE

Clone	Bloc ou Champ *	N° d'arbre	Codification
PR. 107	Bloc 3/2	B 041	P-1
	3/2	B 175	P-2
	3/2	B 196	P-3
	3/2	B 008	P-4
	3/2	B 200	P-5
	3/2	B 155	P-6
	3/2	B 162	P-7
	3/2	B 057	P-8
BD.5	Champ A	B 03	B-1
	A	B 34	B-2
	A	B 69	B-3
	A	B 53	B-4
	V-B	B 24	B-5
	V-A	B 04	B-6
	V-A	B 07	B-7
	Bloc 1/4	O 43	B-8
WARING 4	Bloc 3/1	B 160	W-1
	3/1	B 149	W-2
	3/1	B 237	W-3
	3/1	B 224	W-4
	3/1	B 212	W-5
	3/1	B 234	W-6
	3/1	B 203	W-7
Tjir.1	Bloc 2/1	B 193	T-1
	2/1	B 195	T-2
	Champ V-A	B 20	T-3
	Bloc 1/4	B 075	T-4
* Inst. Rech. Caout. Viêtnam, Station expérimentale de Laikhô.			

II - TECHNIQUES EXPERIMENTALES

A - INTRODUCTION

Voulant déceler l'existence et l'intensité du fonctionnement d'un certain nombre de réactions métaboliques au sein du latex "in vitro", en modifiant au minimum les conditions d'équilibre prévalant au sein de ce latex, il paraît évident que la méthode qui s'impose d'elle-même consiste à utiliser des composés radioactifs. Des composés marqués au C^{14} et au P^{32} ont seuls été utilisés dans ce travail, à des concentrations le plus souvent inférieures à $1.10^{-3}M$, donc peu susceptibles de modifier notablement les équilibres existant dans le latex.

L'étude des métabolismes de base effectifs au sein du latex ainsi que celle de la biosynthèse du caoutchouc, repose en fait sur l'analyse d'un certain nombre de composés résultant de ces divers métabolismes. Une telle étude implique donc un arsenal assez complet de méthodes analytiques portant, d'une part sur le produit final: le caoutchouc, et d'autre part sur des métabolites divers, tels les acides organiques, les glucides, les acides aminés, etc...

Le fait de travailler sur un produit renfermant en moyenne 35 % de caoutchouc implique soit d'utiliser des méthodes particulières, soit de modifier plus ou moins profondément les méthodes classiques.

Nous avons donc rassemblé dans ce chapitre les méthodes que nous avons employées pour l'analyse d'un certain nombre de constituants organiques du latex, ainsi que les méthodes utilisées pour l'incubation de divers composés marqués et pour l'analyse de la radioactivité de plusieurs groupes de composés résultant de l'incubation de ces promoteurs.

Un certain nombre des méthodes décrites ici ayant été récemment diffusées dans des publications (31)(24)(142), nous nous sommes contentés, dans ce cas, d'en donner le principe et la référence.

B - ANALYSE DE DIVERS CONSTITUANTS ORGANIQUES DU LATEX.

1 - Séparations préliminaires

Avant d'entreprendre l'analyse, au sein du latex, de quelque composé que ce soit, le premier problème qui se pose est de séparer la phase caoutchouc qui peut représenter 30 à 45 % du total.

a) Elimination de la phase caoutchouc

Plusieurs méthodes sont utilisables :

α) Coagulation formique (24)

Le latex est acidifié à pH 4 par l'acide formique, puis le sérum recueilli déprotéinisé par chauffage sert généralement à la séparation des acides organiques sur colonne de résine. Des dosages ont montré qu'en

complémentant un latex en acides citrique et malique, la récupération est de 94 %.

β) Coagulation trichloracétique (24)

La coagulation trichloracétique permet une meilleure élimination des protéines que la précédente. Elle a été utilisée pour la détermination des glucides, des acides aminés, du phosphore, des composés phosphorylés et des acides cétoniques. L'efficacité de la méthode a été expérimentée en complémentant en acides aminés et en glucides, les premiers ont été récupérés à 97 %, les seconds à 97,3 %.

γ) Coagulation éthanol-acide formique

Le principe de cette méthode, qui est plus générale, est de coaguler le latex goutte à goutte dans un mélange éthanol-acide formique bouillant (24, 31). Elle a été largement utilisée pour l'analyse des produits intermédiaires.

δ) Séparation par ultracentrifugation

La méthode d'ultracentrifugation de COOK et SECKAR (56) permet d'éliminer la phase caoutchouc du latex en lui conservant toute son activité enzymatique. Nous l'avons souvent utilisée, dans le but de dialyser un latex privé de sa phase caoutchouc.

b) Séparation des constituants solubles du sérum

Il est le plus souvent indispensable pour l'analyse qualitative, comme pour l'analyse quantitative, de séparer les divers métabolites intermédiaires, suivant leur fonction.

α) méthode utilisée

Nous avons employé les méthodes classiques utilisant 2 colonnes de résines montées en série, la résine cationique précédant l'anionique. De la première de ces résines les acides aminés sont élués par l'ammoniaque N, tandis que les acides organiques et l'acide phosphorique fixés sur la 2ème colonne en sont élués par HCOOH 10 N. Les glucides, pratiquement non ionisés, ayant traversé les 2 lits de résine sans être fixés sont recueillis à la sortie de la 2ème colonne (24) (31). Les divers éluats des colonnes sont concentrés sous vide (acides aminés, glucides), ou sous infra-rouge dans une hotte fortement ventilée (acides organiques), avant d'être utilisés pour des analyses ultérieures.

β) % de récupération et reproductibilité

Cette méthode de séparation sur échangeurs d'ions, éprouvée avec des solutions synthétiques d'acides aminés, d'acides organiques et de glucides, donne des récupérations satisfaisantes comme le montre le tableau 8.

La reproductibilité de la méthode de coagulation et d'extraction sur colonne a été vérifiée sur 12 aliquotes d'un même latex, elle s'est avérée satisfaisante (Tableau 9).

En complémentant 6 aliquotes d'un latex par une quantité connue de métabolites intermédiaires et en les analysant comparativement à 6 aliquotes non complémentées, nous avons déterminé le pourcentage de récupération (tableau 10).

Tableau 8: RECUPERATION D'UNE SOLUTION SYNTHETIQUE APRES PASSAGE SUR DES COLONNES D'ECHANGEURS D'IONS
(12 mesures)

	Ac. aminés	Glucides	Ac. organ.
Récupération en %	96	99	90
Ecart type: σ	$\pm 0,066$	$\pm 1,02$	$\pm 0,004$
Coefficient de variabilité Cv %	± 2	± 1	± 2

Tableau 9: REPRODUCTIBILITE DE L'EXTRACTION ETHANOL-ACIDE FORMIQUE ET DE LA SEPARATION SUR COLONNES

	Ac. aminés	Glucides	Ac. organ.
Ecart type: σ	$\pm 0,03$	$\pm 5,36$	$\pm 0,017$
Coefficient de variabilité Cv %	± 2	± 3	± 3

Tableau 10: RECUPERATION D'UNE SOLUTION SYNTHETIQUE AJOUTEE A UN LATEX

	Ac. aminés (mmol. % g de latex)	Glucides (mg glucose % g latex)	Ac. organ. (méq. % g de latex)
Latex témoin	1,25	188	6,11
Latex complémenté	1,96	381	13,0
Valeur du complément	0,88	190	8,53
Valeur théorique	2,13	378	14,64
Quantité récupérée (%)	92 %	101 %	89 %

En dépit de ces défauts, cette méthode combinée à l'extraction coagulante par le mélange d'éthanol-acide formique n'en a pas moins été utilisée pour la quasi totalité des incubations de molécules marquées au C^{14} sur latex.

2 - Analyse quantitative et qualitative des acides organiques

Nous considérerons successivement 3 catégories d'acides organiques: les acides fixes, les acides cétoniques et les acides volatils. L'acide phosphorique est pratiquement le seul acide minéral du latex; il apparaîtra au côté des acides organiques fixes dans les séparations ultérieures.

a) analyse des acides fixes

α) Dosage global

Il suffit d'éliminer par évaporation l'acide formique ayant servi à l'élution de la résine pour être en mesure de doser par alcalimétrie la totalité des acides fixes. Le dosage colorimétrique du phosphore (voir plus loin) permet, après calcul, de déterminer l'acidité fixe correspondant aux acides organiques.

β) Séparation des acides organiques fixes sur gel de silice

Nous avons utilisé la technique de chromatographie de partage sur gel de silice de BULLEN, WARNER et BURREL (52) à partir d'un sérum de coagulation formique; la méthode a été éprouvée dans nos conditions opératoires (24). La figure 8 illustre la séparation obtenue pour les acides organiques du latex.

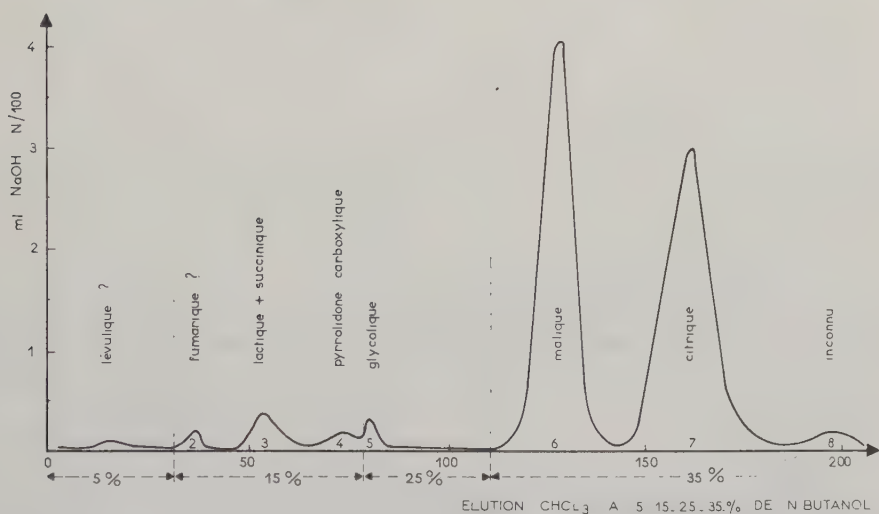


Figure 9: SEPARATION DES ACIDES ORGANIQUES FIXES SUR GEL DE SILICE

γ) Séparation des acides organiques fixes sur échangeur d'anion Dowex 1 × 8.

La méthode précédente devient d'un emploi très délicat lorsque le degré hygrométrique dépasse 95 %. Ceci nous a amenés à étudier la séparation des acides organiques sur colonne d'échangeur d'ions. La méthode de PALMER (133) conjuguée avec un dispositif très simple permettant l'utilisation d'un gradient d'élution, s'est avérée très satisfaisante (142).

δ) Dosage colorimétrique des acides citrique et malique.

Les acides citrique et malique peuvent représenter 90 % de l'acidité organique fixe et sont donc aisément dosables colorimétriquement.

- L'acide citrique est dosé directement sur un sérum de coagulation formique ou sur l'ensemble des acides organiques après séparation sur échangeur par la méthode de NATELSON et coll. (128) (141).
- L'acide malique est dosé colorimétriquement sur une solution d'acides organiques après élimination des glucides en utilisant une adaptation de la méthode préconisée par NITSCHKE (130) (141).

e) Chromatographie sur papier

Nous avons utilisé, de façon systématique, des chromatographies bidimensionnelles afin de déterminer la radioactivité des acides organiques résultant des incubations de promoteurs marqués.

Deux systèmes de solvants acides et basiques ont été indifféremment employés, selon les disponibilités en solvants, car ils conduisent à des résultats identiques.

Solvant acide		Solvant basique	
I. n-propanol	: 50	I. n-propanol	: 60
Eucalyptol	: 50	Ammoniaque	: 40
Acide formique	: 20		
Eau : quantité suffisante pour trouble persistant			
II. Isopropanol	: 40	II. Ethanol absolu	: 80
Eucalyptol	: 60	Ammoniaque	: 5
Acide formique	: 20	OH ₂	: 15
OH ₂	: 10		

Le développement des chromatogrammes a été conduit dans une salle thermostatée à 25°C. Nous avons utilisé comme révélateur le vert de bromocrésol, amené à pH 8, le détail des techniques a été donné par ailleurs (24) (31) (fig. 9).

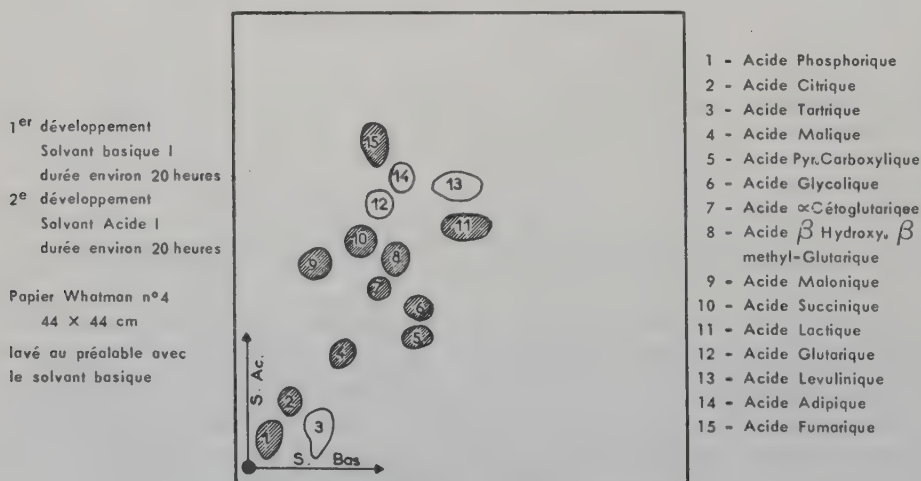


Figure 10: ACIDES ORGANIQUES EN CHROMATOGRAPHIE BIDIMENSIONNELLE

Les acides marqués en noir sont ceux qui apparaissent dans une chromatographie des acides du latex, soit par suite de leur acidité, soit par suite de leur radioactivité après incubation d'acétate 2-C¹⁴.

b) Analyse des acides cétoniques

Les acides α -cétoniques des milieux biologiques sont tous relativement labiles et ils ne résistent pas, pour la plupart, aux extractions à chaud et au passage sur échangeurs d'ions; aussi avons nous employé des sérums trichloracétiques frais pour les analyser.

α) Dosage colorimétrique des acides cétoniques

Nous avons utilisé la méthode de FRIEDEMANN (71), qui consiste à préparer les 2-4-dinitrophénylhydrazones dans des conditions bien déterminées, afin de distinguer les acides α -cétoniques mono-carboxyliques des dicarboxyliques (142).

β) Séparation des 2-4-dinitrophénylhydrazones sur colonne de cellulose

Nous avons appliqué la méthode de séparation sur colonne de cellulose des acides α -cétoniques préconisée par DREW et coll. (61); cette méthode s'est avérée satisfaisante, notamment pour séparer les acides oxalacétique et α -cétoglutarique.

γ) Chromatographie sur papier des 2-4-dinitrophénylhydrazones

Parmi les systèmes de solvants expérimentés pour la séparation des 2-4-dinitrophénylhydrazones des acides cétoniques. Nous avons retenu, comme le plus efficace dans nos conditions opératoires, le solvant tertiaire suivant:

Alcool amylique tertiaire:	50
Ethanol	: 10
Eau	: 40

Ce solvant est employé en chromatographie ascendante avec un papier Whatman n° 4 tamponné par trempage dans une solution de phosphate de K 0,2 M, ajustée à pH 6,2.

Les 2-4-dinitrophénylhydrazones des acides cétoniques ont été préparés selon la technique décrite en détail par RANSON (146).

L'application de ces techniques à l'analyse qualitative des acides α -cétoniques du latex a montré que ceux-ci étaient essentiellement constitués d'acides α -cétoglutarique et pyruvique.

c) Analyse des acides volatils

α) Dosage quantitatif

Nous avons vu précédemment que les acides gras volatils du latex (V.F.A.) n'étaient pas sans relation avec le développement microbien du latex (114). Le dosage de ces acides a donc été soigneusement défini (137) (138) (142).

La méthode consiste à coaguler le latex à chaud par une solution saturée de sulfate d'ammonium; le sérum, après clarification par chauffage, est ensuite acidifié par SO_4H_2 et les acides volatils sont entraînés à la vapeur dans un appareil MARKHAM. Les acides volatils sont finalement dosés par alcalimétrie sur un distillat dont le volume représente 10 fois celui de la prise d'essai.

β) Dosage qualitatif et quantitatif par séparation sur colonne de silice

Le dosage précédent conduit, dans ces conditions, à une détermination globale de l'ensemble des acides volatils; afin d'obtenir une séparation et un dosage individuel de ces acides, nous avons utilisé la méthode de séparation des acides organiques sur gel de silice, précédemment décrite, avec quelques modifications.

Les distillats ayant servi au dosage volumétrique des acides volatils après entraînement à la vapeur, sont neutralisés, en léger excès, puis concentrés à volume réduit à l'évaporateur rotatif, sous vide et, finalement, portés à sec dans une capsule en chauffant sous infra-rouge. Les résidus sont repris par 1 g de silice et 0,5 ml de SO_4H_2 d'une normalité telle qu'il y ait un excès d'acidité de 0,5 méq., en tenant compte de l'alcalinité apportée. L'homogénat est ensuite introduit sur une colonne de silice préparée dans les conditions habituelles (24); celle-ci est éluée par 65 ml de chloroforme à 5 % de butanol, 60 ml à 10 % et 100 ml à 15 %. La figure 10 représente une séparation des acides volatils sur latex frais.

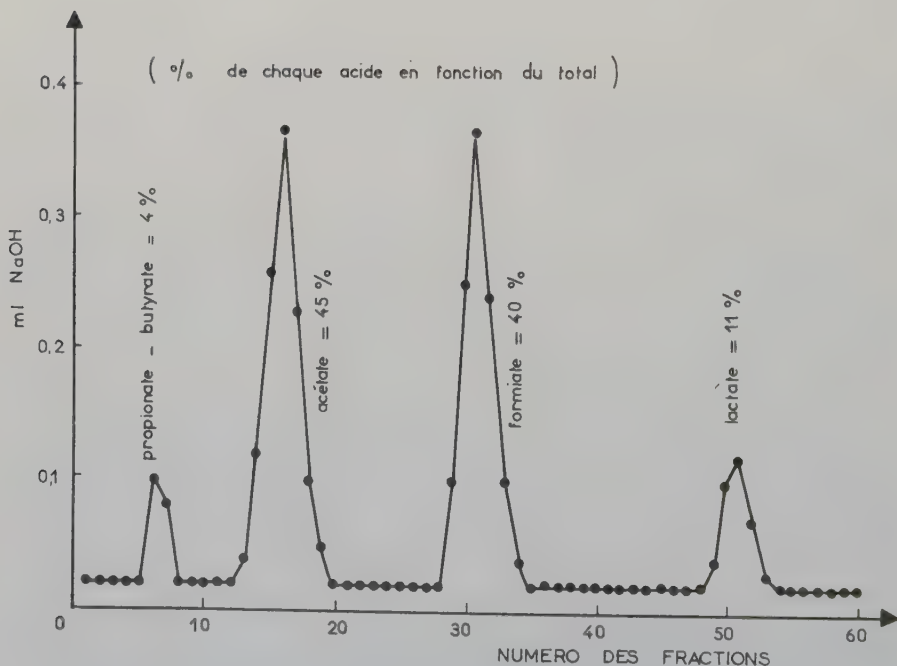


Figure 11: SEPARATION SUR COLONNE DE SILICE
DES ACIDES VOLATILS DU LATEX
méq. % g : 0,05

3 - Analyse quantitative et qualitative des acides aminés

a) Dosage global

Les acides aminés peuvent être dosés directement, soit sur un sérum de coagulation trichloracétique, soit mieux, sur un éluat ammoniacal après séparation sur colonne d'échangeur cationique fort (24).

Nous avons employé pour le dosage global des acides aminés deux méthodes, différentes dans leur principe. La première est une colorimétrie à la ninhydrine dérivée de MOORE et STEIN (119) et modifiée par WIGGINS et WILLIAMS (195);

La seconde méthode, mise au point par SPIES (165), utilise l'absorption dans l'ultra-violet des sels de cuivre des acides aminés.

b) Séparation des acides aminés en neutres, acides et basiques

Le principe de la séparation des différentes classes d'acides aminés en fonction de leur charge est connu depuis déjà longtemps. Nous avons utilisé le principe de WINTERS et KUNIN (196) en changeant toutefois les résines (24). La figure 11 en illustre le principe

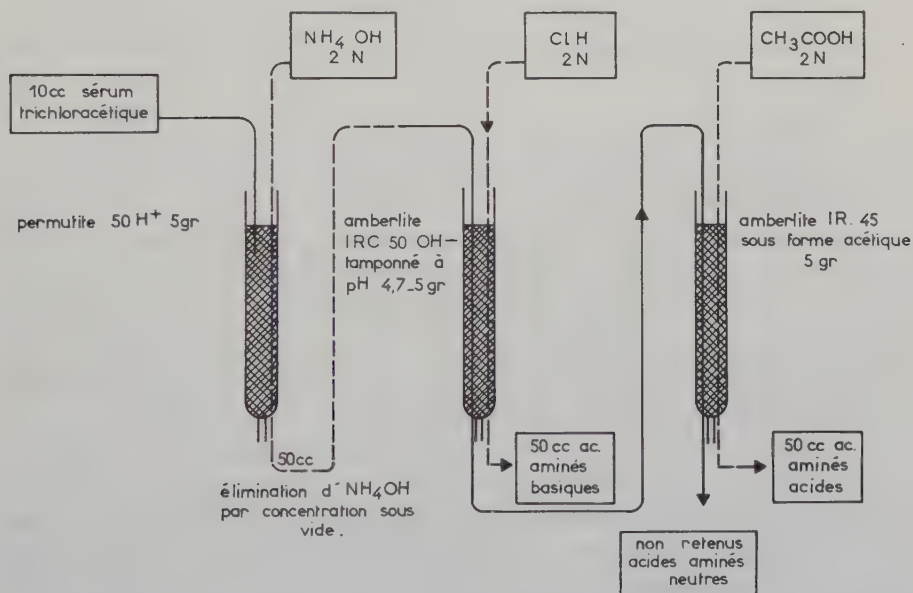


Figure 12: SEPARATION DES ACIDES AMINES EN NEUTRES, ACIDES ET BASIQUES SUR UN SERUM TRICHLORACETIQUE.

Il est, par ailleurs, aisé de séparer quantitativement et individuellement les acides aspartique et glutamique d'un sérum de coagulation formique sur une colonne de Dowex 1×8 sous forme acétate. Après lavage

de la colonne par 100 ml d'eau, celle-ci est éluée par l'acide acétique 4 N, avec un système à gradient d'élution.

c) Analyse qualitative par chromatographie sur papier

La détermination qualitative des acides aminés a été effectuée en utilisant un certain nombre de techniques diverses (24) (87) (92). Outre le classique solvant butanol-acide acétique-eau (4-1-5), les solvants phénols employés sur papier tamponné à divers pH, selon la technique de Mac FARREN (63), ont été largement utilisés. En chromatographie bidimensionnelle, la technique de LEVY et coll. (109) a toujours donné d'excellents résultats.

4 - Analyse quantitative et qualitative des glucides

a) Analyse quantitative

Le glucose, le fructose et le saccharose ont été dosés globalement et très simplement par colorimétrie à l'anthrone (181) (19). L'application au latex de cette méthode et sa reproductibilité ont été décrites par ailleurs (24).

b) Analyse qualitative par chromatographie sur papier

L'analyse qualitative des glucides du latex par chromatographie sur papier a été menée à bien en utilisant le solvant: pyridine-alcool isoamylique-eau (7-7-2), en chromatographie ascendante, avec développement multiple, (27) (24).

5 - Analyses diverses

a) Analyse du phosphore et de ses composés

α) Analyse quantitative

Le phosphore total, le phosphore minéral et diverses autres formes de phosphore sont dosés colorimétriquement en utilisant le complexe bleu molybdo-molybdique obtenu avec le sulfate d'hydrazine comme réducteur (26).

Par la suite, nous avons utilisé la méthode de BEREMBLUM et CHAIN (40) plus spécifique du P minéral.

D'autre part le dosage du phosphore énergétique labile (P.e.l.) provenant des phosphonucléotides, tels que l'ATP, a été effectué selon la méthode de CRANE et LIPMANN (58) dont le principe est de fixer les composés phosphorylés nucléotidiques sur charbon, puis de libérer le P.e.l. de celui-ci par une hydrolyse ménagée. Nous avons pu vérifier que, ni le phosphore minéral, ni le phosphore glucidique du latex n'étaient retenus sur le charbon. D'autre part la reproductibilité de la méthode est apparue très satisfaisante puisque le coefficient de variabilité obtenu n'a été que de 2,4 % (141).

β) Analyse qualitative des composés phosphorylés

Nous avons analysé qualitativement par chromatographie sur papier certains composés phosphorylés. C'est notamment le cas de l'acide 3-phosphoglycérique (3-PGA).

Les composés phosphorylés ont été extraits du latex, par coagulation trichloracétique, puis fractionnés en utilisant la solubilité de leur sel

de baryum en milieu aqueux ou alcoolique avant d'être chromatographiés (181).

Nous avons retenu les systèmes solvants suivants qui donnaient les meilleurs résultats dans nos conditions opératoires :

Acide butyrique 10 vol.	n-Propanol	75
NH ₄ OH N 3 vol.	Ac. trichloracétique solution saturée	5
	NH ₄ OH (d = 0,9)	0,3
	E.D.T.A. 0,02 %	20

Ces solvants sont utilisés en chromatographie ascendante, sur papier Whatman n° 4 lavé au sequestrène, en système mono- ou bi-dimensionnel. La révélation des spots se fait en combinant le réactif de HANES et ISHERWOOD (77) et la lumière ultra-violette de longueur d'onde moyenne.

C - INCUBATION DE DIVERS COMPOSES RADIOACTIFS

Les méthodes utilisées pour l'incubation de divers promoteurs marqués diffèrent selon qu'il s'agit des incubations de composés fixes, de C¹⁴O₂ ou de phosphate marqué.

1 - Incubations de composés fixes marqués au C¹⁴ sur latex

Nous avons toujours utilisé la même méthode d'incubation pour tous les composés organiques fixes quelqu'ils soient: acétate 1 ou 2-C¹⁴, malonate 1 ou 2-C¹⁴, succinate 2-3-C¹⁴, etc...

a) Méthode d'incubation

Des travaux antérieurs (134) (102) ont montré que l'activité enzymatique du latex frais était très influencée par toute dilution, même minime. Ceci ne saurait surprendre aujourd'hui puisque l'on a vu précédemment que les lutoïdes, extrêmement sensibles à toute variation de la pression osmotique, sont susceptibles de libérer dans le milieu des polyphénol-oxydases, des phosphatases et de l'ATP-ase (80) (34) (143).

Ces considérations nous ont conduits à introduire les promoteurs marqués et les modifiants en solutions qui sont ensuite lyophilisées dans des tubes à essai (17×170) maintenus en position verticale afin d'éviter des pertes éventuelles par entraînement mécanique du produit sec en fin de lyophilisation.

Une analyse des conditions d'incubation (31), a permis de préciser les facteurs intervenant dans le rendement de l'incubation en utilisant l'incorporation de la radioactivité de l'acétate 2-C¹⁴ dans le caoutchouc. Cette étude dont les principaux résultats sont illustrés dans les figures 13 à 18 nous a conduits à utiliser systématiquement les conditions d'incubation suivantes :

- Matériel: Tube à essai de 20 à 30 ml bouché par un coton
- Latex frais: 1 ml
- Promoteur: 2,5 à 5 microcuries de substrat d'activité spécifique comprise entre 2 et 10 mCi/mMol, hormis pour le glucose U-C¹⁴, 50-80 mCi/mMol.
- Température d'incubation : 30° C (bain-marie thermostatique)
- Durée d'incubation : 3 heures, sauf cas d'exceptionnelle instabilité: 1 heure

- Agitation : Outre l'agitation initiale, agitation manuelle lente de quelques secondes toutes les 15 minutes.

Un certain nombre d'incubations ont été effectuées au manomètre de Warburg avec quelques-uns des promoteurs usuels dans le but de déterminer le dégagement de $C^{14}O_2$. Les conditions étaient alors les suivantes :

- Matériel : Fiole de Warburg à cupule centrale et à diverticule latéral d'un volume d'environ 12 ml.
- Latex : 1 ou 2 ml d'un latex additionné de 0,1 % d'Emulgane 0
- Promoteur : 2,5 à 5 μCi d'activité spécifique comprise entre 2 et 10 mCi/mMol,
- Température d'incubation : 30° C.
- Agitation : 110-120 périodes par minute.
- Cupule centrale : Papier filtre plissé imprégné de 0,2 ml de KOH à 5 %

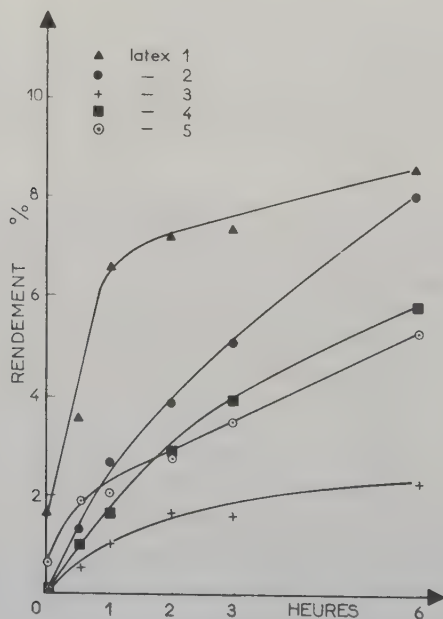


Figure 13: INFLUENCE DU TEMPS D'INCUBATION SUR LE RENDEMENT DE LA TRANSFORMATION DE L'ACETATE 2- C^{14} EN CAOUTCHOUC

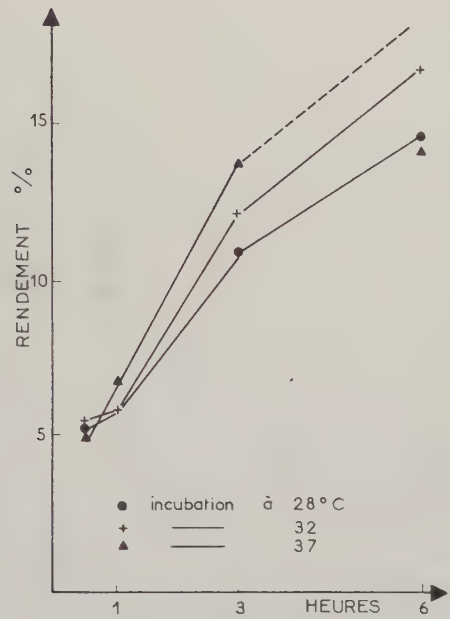


Figure 14: INFLUENCE DE LA TEMPERATURE SUR LE RENDEMENT DE LA TRANSFORMATION DE L'ACETATE 2-C¹⁴ EN CAOUTCHOUC POUR LES TEMPS D'INCUBATION VARIABLES

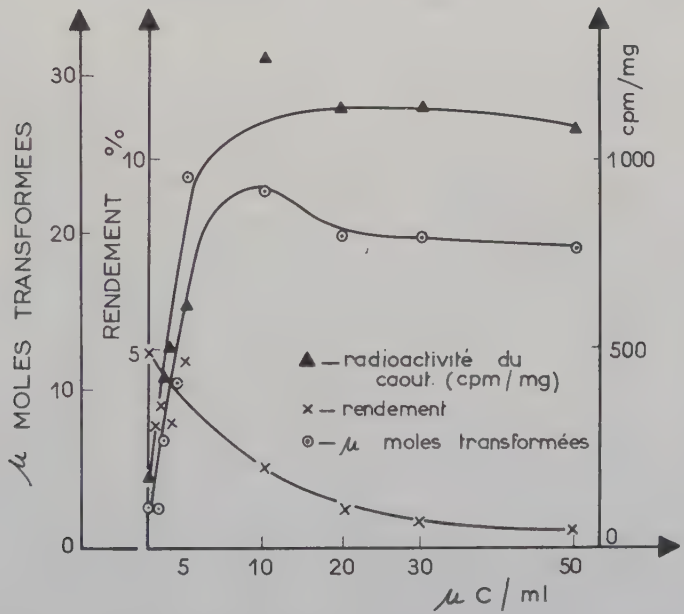


Figure 15: INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN SUBSTRAT ($\mu\text{Ci/ml}$ de latex) SUR LE NOMBRE DE μmoles D'ACETATE 2-C¹⁴ TRANSFORMEES, LE RENDEMENT DE LA REACTION ET LA RADIOACTIVITE DU CAOUTCHOUC

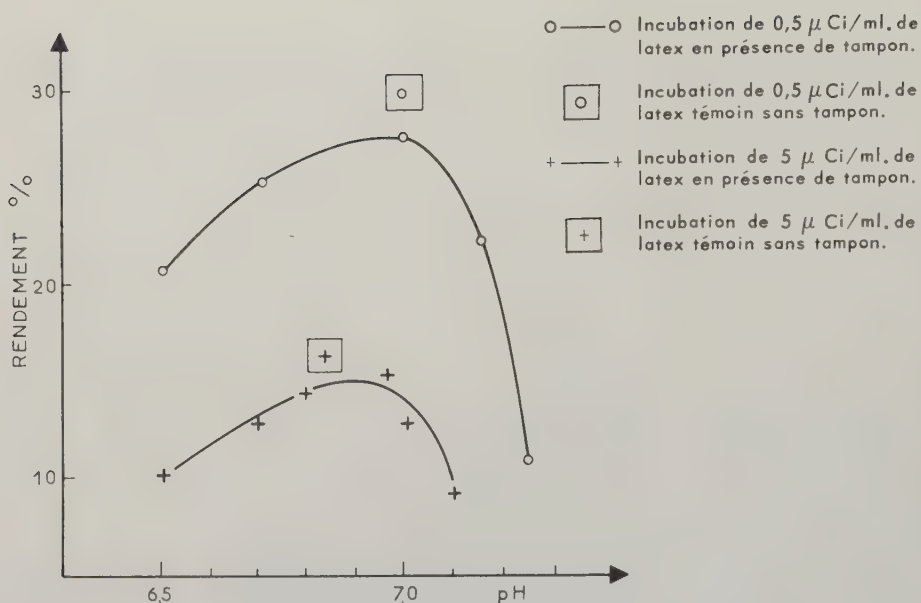


Figure 16: INFLUENCE DU pH DU LATEX SUR LE RENDEMENT DE LA TRANSFORMATION DE L'ACETATE 2-C¹⁴ EN CAOUTCHOUC

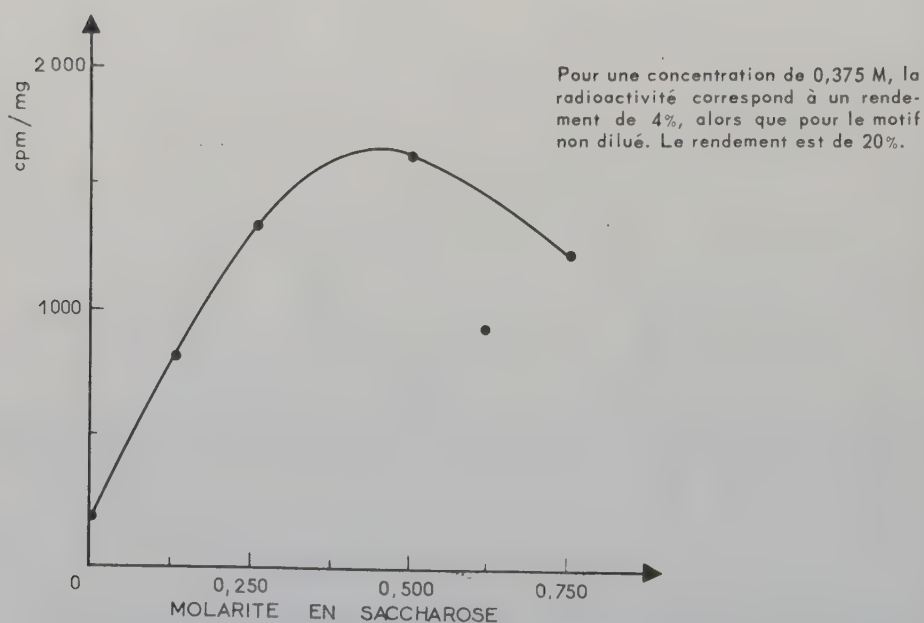


Figure 17: INFLUENCE DE LA DILUTION DU LATEX PAR 1 VOLUME D'UNE SOLUTION DE SACCHAROSE DE MOLARITE CROISSANTE.

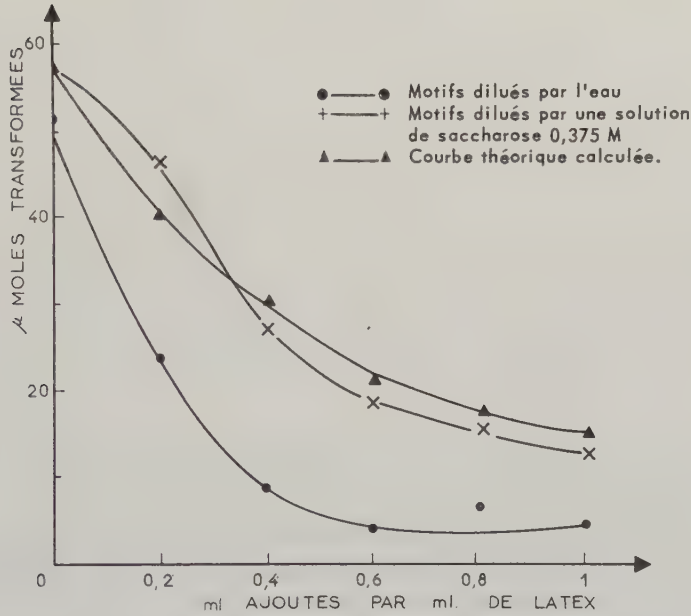


Figure 18: INFLUENCE DE LA DILUTION PAR L'EAU OU PAR LE SACCHAROSE SUR LE NOMBRE DE μ MOLES D'ACETATE $2-C^{14}$ TRANSFORMEES EN CAOUTCHOUC

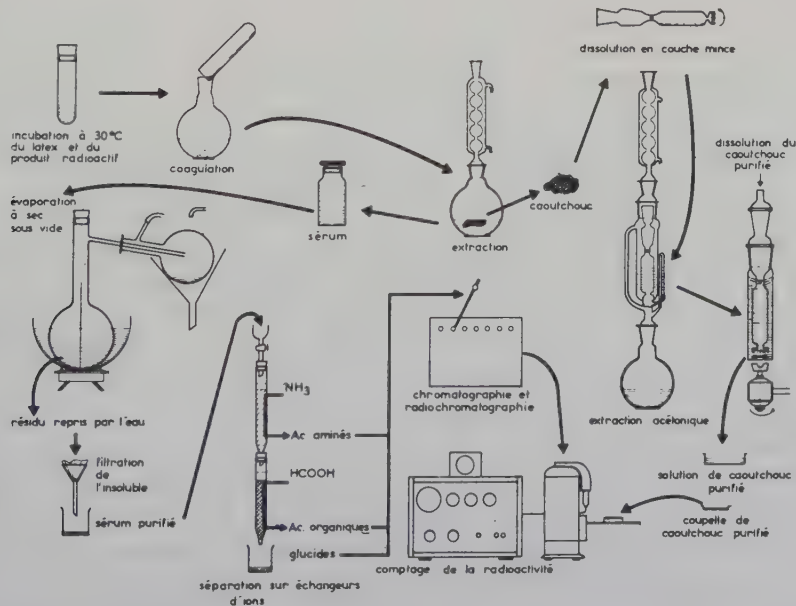


Figure 19: SCHEMA D'UNE INCUBATION DE PRODUIT RADIOACTIF DANS LE LATEX.

b) Détermination de la radioactivité des métabolites intermédiaires

En fin d'incubation, le latex est coagulé goutte à goutte dans un mélange éthanol-acide formique bouillant. Les acides aminés, glucides et acides organiques sont séparés sur colonne d'échangeurs d'ions, puis analysés par chromatographies mono- ou bi-dimensionnelles. Des radiochromatographies sont ensuite réalisées en appliquant les chromatogrammes contre des films sensibles aux rayons X, pendant une période de 4 semaines (fig. 19).

La détermination de la nature du composé constituant les spots est basée, d'une part sur la parfaite coïncidence du spot radioactif avec celui du composé non radioactif, introduit en témoin interne dans le chromatogramme et, d'autre part sur la coïncidence des pics correspondant à la sortie des composés radioactifs et témoins, sur les colonnes de silice ou d'échangeur d'ions.

La radioactivité des spots décelés par radiochromatographie peut être aisément mesurée au moyen d'un tube GEIGER. Le rendement du compteur est dans ces conditions de l'ordre de 2,5 %.

Nous avons éprouvé la reproductibilité de cette détermination en effectuant 11 chromatographies sur un homogénat d'acides organiques provenant de plusieurs incubations. La radioactivité de 6 spots a été déterminée sur chaque chromatogramme. Le coefficient de variabilité de la mesure est donné dans le tableau 11.

L'examen du tableau montre que le Cv le plus fort concerne l'acide α -céto-glutarique; ce résultat ne saurait étonner, car celui-ci, relativement labile, se décompose partiellement lors de la chromatographie et apparaît à la révélation plus sous forme de traînée que de spot bien défini. On constate donc, dans l'ensemble, que la méthode utilisée conduit à un Cv au plus égal à 15 %; ce qui fait qu'on n'attachera pas d'importance à des résultats isolés pour lesquels la radioactivité diffère de moins de 30 %.

Tableau 11: DETERMINATION DE LA RADIOACTIVITE DES ACIDES ORGANIQUES SUR 11 CHROMATOGRAMMES CORRESPONDANT A UN MEME DIALYSAT

Valeur	Radioactivité des acides organiques en cpm brut					
	Citrique	Malique	α -céto-glutar.	Malon.	Succin.	Fumar.
Minimale	123	114	101	58	776	102
Maximale	148	134	233	91	1035	137
Moyenne	134	125	145	76	870	118
Cv %	$\pm$ 6,2	$\pm$ 4,9	$\pm$ 29	$\pm$ 15,2	$\pm$ 9,4	$\pm$ 8,5

Nous avons très largement employé cette méthode pour déterminer la variation de la radioactivité des acides organiques et des acides aminés sous l'influence de facteurs divers. Cependant, dans des cas particuliers,

on a eu recours à des séparations sur colonnes, décrites précédemment; la radioactivité des éluats est mesurée alors, après pipettage d'une fraction aliquote, sur des coupelles sur lesquelles a été déposé, au préalable, 0,1 à 0,2 ml de baryte N/10. La détermination de la radioactivité est faite au moyen d'un compteur à flux de gaz.

c) Détermination de la radioactivité du caoutchouc

La mesure de la radioactivité du caoutchouc résultant de l'incubation d'un substrat radioactif approprié nécessite, au préalable, l'élimination de toutes traces de ce promoteur, ainsi que des produits intermédiaires qu'il a pu engendrer. Pour effectuer cette purification, nous avons utilisé la méthode préconisée par KEKWICK et coll. (102), que nous avons éprouvée et décrite en détail par ailleurs (31); le caoutchouc obtenu en film mince après dissolution dans le chloroforme est extrait à l'acétone, puis redissous dans le chloroforme; la solution ensuite est filtrée et concentrée avant d'être déposée sur coupelles.

Après séchage et pesée, la radioactivité des coupelles est déterminée au moyen d'un tube GEIGER. Le dispositif de comptage a été étalonné au préalable en utilisant du polyméthacrylate de méthyle d'activité spécifique connue (2200 cpm/mg).

Après correction, la radioactivité exprimée en cpm/mg est, en général, transformée de façon à obtenir soit le rendement de la réaction, soit le nombre de micromoles transformées (31).

d) Etude de la reproductibilité de l'incubation

Dans une première étape, nous avons cherché à déterminer la reproductibilité de la méthode d'incubation précédente conjuguée à la séparation et à l'analyse des produits radioactifs. Pour cela, nous avons effectué 2 séries d'incubations sur le latex d'un même arbre, mais provenant de 2 saignées successives. Chaque série comportait 12 incubations de 5 microcuries d'acétate 2-C^{14} réalisées sur 12 aliquotes du latex en question. Nous avons analysé le rendement de la transformation de l'acétate 2-C^{14} en caoutchouc marqué et la radioactivité des acides organiques issus de cet acétate. Précisons que la radioactivité de ces derniers est exprimée en cpm brut et que par suite du volume de la solution d'acides organiques déposé sur le chromatogramme (400 mm³/2000), elle correspondait, pour toutes les chromatographies bidimensionnelles, au 1/5ème de la radioactivité brute totale de ceux-ci.

Les résultats reportés dans le tableau 12 montrent qu'il faut s'attendre à une variabilité de l'ordre de 10 % pour la détermination du rendement de la biosynthèse alors qu'elle est comprise entre 5 et 20 % pour la radioactivité des acides organiques. Il est bien évident que, d'une façon générale, les mesures de radioactivité sont d'autant plus précises que l'activité de l'échantillon analysé est plus grande; pour des rendements de la biosynthèse du caoutchouc inférieurs à 1 %, les Cv peuvent dépasser 20 %. Les résultats isolés correspondant à des échantillons de faible activité devront donc être considérés avec une grande prudence. (Tableau 12).

Tableau 12: ETUDE DE LA REPRODUCTIBILITE DE L'INCUBATION D'ACETATE 2-C¹⁴
SUR LATEX

Valeur	Rendement % de la biosynthèse		Radioactivité des acides organiques en cpm											
			Citrique		Malique		Glycolique Pyr.-Carb.		Malonique		Succinique		HMG	
Expér. n°	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Minimale	2,8	4,1	334	249	223	306	722	602	20	43	125	125	29	248
Maximale	3,5	4,7	432	339	283	354	880	845	27	56	187	190	61	340
Moyenne	3,1	4,4	382	281	252	345	789	750	24	53	156	156	47	294
Cv %	10,0	4,5	8,8	11,6	8,2	6,5	7,4	9,2	9,8	6,9	11,3	15,3	14,0	8,3

Incubation de 5 μ Ci d'acétate 2-C¹⁴ par ml de latex (3 heures à 30° C.) m.v. : B-2

Dans une 2ème étape précédemment décrite (31), on a effectué d'une part, 6 saignées consécutives suivant l'alternance normale sur un Tjir.1 et, d'autre part, 12 saignées sur un Waring 4; à chacune de ces saignées, 6 incubations ont été effectuées sur des aliquotes du latex en question. Nous avons utilisé le rendement de la biosynthèse du caoutchouc marqué comme critère de variabilité. Les résultats figurent dans le tableau 13.

Tableau 13: VARIABILITE DU RENDEMENT DE LA TRANSFORMATION D'ACETATE 2-C¹⁴ EN CAOUTCHOUC RADIOACTIF SUR LES LATEX PROVENANT DE SAIGNEES SUCCESSIVES D'UN ARBRE

Saignée n°	Rdt % de la biosynthèse du Cc.*	
	Expérience 1 Tjir.1	Expérience 2 Waring 4
1	9,56	2,70
2	7,70	2,88
3	12,52	1,57
4	9,74	0,74
5	11,50	0,68
6	10,18	0,78
7	-	0,57
8	-	5,96
9	-	1,41
10	-	3,73
11	-	3,96
12	-	4,37
Moyennes :	10,20	2,44
Cv % :	± 16,3	± 72,1
Incubation de 5 µCi d'acétate 2-C ¹⁴ par ml de latex (3 heures à 30° C).		

Ceux-ci sont à comparer, sur le plan enzymatique, à ceux obtenus dans le domaine organo-minéral (voir p. 34). Si l'on considère la 2ème expérience pour laquelle le Cv est le plus élevé, on voit qu'il faut rapprocher les variabilités comprises entre 15 et 35 % pour certains éléments minéraux et composés organiques de la variabilité de 72 % obtenue pour le rendement de la biosynthèse du caoutchouc radioactif. Le problème étant vu sous cet angle, on peut expliquer la variabilité apparemment déroutante, obtenue d'une saignée à l'autre par une influence réciproque des activités métaboliques et de la composition organo-minérale du latex "in vitro" comme au sein des laticifères.

2 - Incubations de composés fixes marqués au C¹⁴ sur dialysat

Nous avons étudié également les processus de fixation de l'acétate marqué dans les molécules organiques ainsi que son oxydation totale en CO₂ sur un latex débarrassé de son caoutchouc et dialysé.

a) Méthode d'incubation utilisée

α) Ultracentrifugation du latex

Le latex récolté dans des conditions précédemment décrites est ramené au laboratoire dans la glace et immédiatement ultracentrifugé entre +2 et +5°C, à 40.000 G, dans des tubes en cellulose de 10 ml. A la fin de la centrifugation, la couche médiane constituée par un sérum clair est récupérée, puis la couche supérieure constituée par le caoutchouc est éliminée. Finalement, le culot de centrifugation et le sérum sont mélangés et homogénéisés au Potter. Toute cette manipulation est effectuée en maintenant le latex et ses constituants dans la glace et en utilisant des récipients préalablement refroidis.

β) Conduite de la dialyse

L'homogénat est enfermé dans un tube de dialyse dans lequel on fait barbotter quelques dizaines de secondes un courant d'azote, afin de limiter au maximum l'action des poly-phénol-oxydases. Le tube est ensuite ligaturé serré afin d'éviter une entrée d'eau excessive. Cependant, on conserve à l'intérieur une petite bulle d'azote de manière à assurer une agitation interne du liquide à dialyser. Le tube de dialyse contenant l'homogénat est alors fixé à un agitateur provoquant un mouvement latéral et plongé dans un bécher de 1 à 3 litres disposé sur un agitateur magnétique. La dialyse elle-même est effectuée contre une solution de tampon phosphate ($\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}-\text{PO}_4\text{HK}_2$) 0,02 M à pH 7, ce qui correspond sensiblement tant par la molarité que par le pH aux conditions normales du latex. Tout le système à dialyser est placé dans un réfrigérateur entre +2 et +5°C. La dialyse est maintenue 24 heures en changeant 3 fois le tampon (bécher d'un litre) durant la journée et une fois pour la nuit (bécher contenant 3 litres de tampon frais). Nous avons vérifié que cette technique permet l'élimination quasi absolue des acides organiques, des glucides et des thiols.

γ) Incubation au manomètre de WARBURG

L'incubation elle-même est effectuée au manomètre de WARBURG dans des fioles d'environ 12 ml possédant un diverticule latéral et munies d'une cupule centrale.

δ) Traitement de l'incubat

En fin d'incubation, le papier filtre imprégné de KOH est extrait de la cupule centrale avec une pince et transféré sur un entonnoir. La cupule centrale est ensuite lavée plusieurs fois au moyen d'un compte-gouttes; le lavage du papier filtre est poursuivi, goutte à goutte, jusqu'à ce qu'il ne rosisse plus à l'addition de phénophtaléine. On ajoute dans l'erlenmeyer contenant la solution ainsi obtenue, 50 mg de CO_3Na_2 comme entraîneur, puis 2 ml d'une solution M de Cl_2Ba .

Durant ce temps, le contenu de la partie principale de la fiole a été transféré dans un tube à essai en même temps que 10 ml d'eau de lavage. L'ensemble de la solution est amené à pH 4 par une quantité d'acide formique déterminée préalablement au pH-mètre sur un témoin. L'ensemble ainsi acidifié est porté, en tube bouché, 5 minutes au bain-marie bouillant pour coaguler les protéines et éventuellement quelques particules de caoutchouc non éliminées par ultracentrifugation. L'ensemble est ensuite filtré afin

d'obtenir un sérum clair dont les constituants sont analysés comme précédemment.

Après quelques temps, le CO_3Ba est filtré, lavé, séché, pesé, broyé, puis 10 mg sont introduits sur coupelle d'aluminium (diamètre 30 mm), également répartis, pesés de nouveau et la radioactivité est déterminée au moyen d'un compteur à flux de gaz. Le rendement de ce dispositif est, à finesse infinie, et dans nos conditions opératoires, de l'ordre de 25 %.

b) Etude de la méthode

Afin d'étudier l'efficacité de la dialyse nous avons réalisé une dialyse de 0 à 5 jours sur des aliquotes d'un même homogénat; l'efficacité de la dialyse a été réduite dans cette expérience car la solution tampon n'a été changée que 2 fois par 24 heures.

L'absorption d'oxygène, le rendement de l'oxydation de l'acétate, le dosage de l'acide citrique, des acides aminés et du glucose ont été pris comme critères.

Tableau 14: ETUDE DE LA DUREE DE LA DIALYSE (m.v.: B-1)

Motif	Durée de la dialyse	Absorp. d'O ₂ (*)	Rdt % oxydat. (**)	DOSAGES		
				Ac. citr. mg/ml	Ac. aminés $\mu\text{mol/ml}$	Glucose mg/ml
Témoin	non dialysé	80	1,6	3,1	70	68,5
1	1 jour	460	51	0,1	6,4	0,2
2	2 jours	1120	42	0,0	6,1	0,2
3	3 "	1110	42	0,0	4,0	0,2
4	4 "	1290	51	0,0	4,0	-
5	5 "	970	52	0,0	3,5	0,2
6(+)	5 jours	1100	49	-	-	-

(*) Absorption d'oxygène en μl par ml de dialysat pendant 3 heures d'incubation.

(**) Rendement en % de l'oxydation de l'acétate 2-C^{14} en C^{14}O_2

(+) Au motif 6 on a ajouté par ml de dialysat :
 $0,1 \mu\text{mol}$ ATP, $0,05 \mu\text{mol}$ CoA, $0,05 \mu\text{mol}$ DPN, $0,05 \mu\text{mol}$ Glutathion et $0,5 \mu\text{mol}$ Cl_2Mg .
 Incubation de $5 \mu\text{Ci}$ d'acétate 2-C^{14} par ml de dialysat (3 heures à 30°C .)

Le tableau 14 permet les remarques suivantes :

- L'absorption d'oxygène est fortement augmentée par la dialyse et reste pratiquement constante à partir de 48 heures de dialyse.
- L'oxydation de l'acétate 2-C^{14} en C^{14}O_2 est maximale dès 24 heures et ne varie pas de façon significative au delà.
- L'élimination de l'acide citrique, des acides aminés et du glucose est remarquable durant les premières 24 heures; la variation du taux de ceux-ci ne décroît que faiblement par la suite

- Au motif 6 nous avons ajouté un certain nombre des cofacteurs les plus classiques ; il n'apparaît pas que cet apport ait eu un effet sensible.

De cette expérience, on peut tirer les conclusions suivantes :

- 24 heures sont suffisantes pour dialyser une quinzaine de ml d'homogénat contre 2 fois 3 litres de tampon.
- La concentration ionique correspondant à 0,02 M de tampon phosphate est adéquate pour préserver les particules cellulaires de l'éclatement par suite de phénomènes osmotiques.
- L'apport de cofacteurs ne se justifie pas.
- Du fait qu'après 2,3,4 et même 5 jours de dialyse, le rendement de l'oxydation ne varie pas sensiblement, on est à même de déduire qu'il n'apparaît vraisemblablement pas de développement microbien intense venant perturber l'oxydation de l'acétate 2-C¹⁴.

c) Etude de la reproductibilité de l'incubation

Nous avons vérifié la reproductibilité de l'incubation de composés marqués sur dialysat : en prenant comme critère le rendement de l'oxydation de l'acétate 2-C¹⁴ en C¹⁴O₂ et l'absorption d'oxygène du dialysat.

Dans une première expérience, nous avons effectué 12 incubations sur 12 aliquotes d'un ml obtenu par la dialyse en une seule fois d'une quantité suffisante d'un homogénat de sérum et de culot. Les résultats figurent dans le tableau 15.

Tableau 15 : REPRODUCTIBILITE DE 12 INCUBATIONS SUR UN MEME DIALYSAT

Valeur	Absorption d'oxygène en microlitres/ml de dialysat/3 heures	Rendement en % de l'oxydation de l'acétate 2-C ¹⁴ en C ¹⁴ O ₂
Minimale	965	26,1
Maximale	1040	29,2
Moyenne	1025	28,0
Ecart type	± 22,7	± 0,94
Cv % :	± 2,2	± 3,3
Incubation de 2,5 μ Ci d'acétate 2-C ¹⁴ par ml de dialysat (3 heures à 30° C). m.v. : B-3		

Dans une deuxième expérience réalisée quelques mois plus tard sur le même matériel, nous avons, cette fois, effectué 12 dialyses sur un même homogénat et une incubation par dialysat, mettant donc ainsi en évidence la variabilité due à la dialyse et à l'incubation (Tableau 16).

Tableau 16: REPRODUCTIBILITE D'INCUBATIONS EFFECTUEES SUR 12 DIALYSATS D'UN MEME HOMOGENAT

Valeur	Absorption d'oxygène en $\mu\text{l}/\text{ml}$ de dialysat/3 heures	Rendement en % de l'oxydation de l'acétate 2- C^{14} en C^{14}O_2
Minimale	108	21,9
Maximale	140	27,3
Moyenne	123	24,2
Cv %	$\pm$ 9,9	$\pm$ 6,0
Incubation de 2,5 μCi d'acétate 2- C^{14} par ml de dialysat (3 heures à 30°C). m.v.: B-3		

La variabilité plus élevée que dans l'expérience précédente reste cependant acceptable.

3 - Incubation de C^{14}O_2 sur divers milieux

L'incubation de gaz carbonique marqué au C^{14} implique l'emploi de techniques particulières.

a) Méthode d'incubation utilisée

Le milieu à incuber (latex, sérum ou sérum + culot) est introduit dans un tube à essai court et relativement large; celui-ci est relié par un tube de verre court, de fort diamètre, à un petit flacon contenant 10 μCi de CO_3HNa^* , quelques gouttes de NaOH N , quelques ml d'eau et 1 goutte de rouge de méthyle; on a, par ailleurs, introduit délicatement dans cette bouteille un petit tube contenant 1 à 2 ml de SO_4H_2 10 N. En début d'incubation, le tube d'acide est renversé dans la fiole et l'ensemble est homogénéisé jusqu'à virage de l'indicateur. L'incubation est menée 3 heures à 30°C, dans un thermostat muni d'un système permettant une agitation latérale suffisamment énergique du dispositif d'incubation, afin de faciliter au maximum les échanges gazeux.

En fin d'incubation, les dispositifs sont ouverts, le latex est coagulé par le mélange éthanol-acide formique, tandis que le sérum et le sérum+culot sont amenés à pH 4 par l'acide formique. Dans ce type d'incubation, seules les radioactivités des acides organiques et, éventuellement, des acides aminés sont déterminées.

Notons qu'un certain nombre d'incubations a été effectué au WARBURG, le bicarbonate marqué puis l'acide sulfurique étant alors introduits dans le diverticule latéral.

b) Etude de divers facteurs d'influence

Il importait toutefois de s'assurer que nous travaillions dans des conditions convenables. On pouvait notamment se demander s'il fallait ou non employer du CO_2 non marqué comme entraîneur en conjugaison avec le C^{14}O_2 . A ce propos, il ne faut pas négliger le fait que la présence d'une atmosphère très enrichie en gaz carbonique, aura pour effet secondaire

d'abaisser le pH du latex comme le montre le tableau 17. Il apparaît qu'au delà de 20 mg de CO_3Na_2 , son effet est très net.

Tableau 17: INFLUENCE DE LA QUANTITE DE CO_2 ENTRAINEUR SUR LE pH DU MILIEU

CO_3Na_2	CO_2 (μmol)	pH
0 mg	0	6,40
5	47	6,40
10	94	6,35
20	188	6,35
50	470	6,30
75	705	6,25

Nous avons réalisé une expérience dans laquelle 10 μCi de C^{14}O_2 ont été incubées sur sérum en présence d'un taux croissant de CO_3Na_2 . Le critère choisi était la radioactivité des acides citrique et malique.

Tableau 18: INFLUENCE DE LA QUANTITE DE CO_2 INTRODUITE SUR LA RADIOACTIVITE DU CITRATE ET DU MALATE

CO_3Na_2 mg	CO_2 micromol.	Radioactivité des acides organiques en cpm					
		Exp. 1 m.v.: P - 1		Exp. 2 m.v.: B - 2		Exp. 3 m.v.: T - 1	
		Citrate	Malate	Citrate	Malate	Citrate	Malate
0	0	120	90	100	80	460	550
10	47	80	80	50	90	370	410
25	235	40	30	30	70	210	330
75	705	10	10	10	60	80	150

Le tableau 18 montre que l'apport de gaz carbonique non marqué, comme entraîneur, a un effet dépressif sur la synthèse du citrate et du malate radioactifs et ne se justifie donc pas.

D'autre part, on sait que le latex, après saignée, dégage normalement une quantité importante de CO_2 hors de proportion avec la respiration (174). On peut être tenté d'éliminer une part de ce CO_2 par dégazage sous vide du milieu avant l'incubation. Pour ce faire, divers latex, sérum et sérum+culet ont, ou non, été amenés quelques secondes, dans la glace, à une pression de 20 mm de mercure. Les résultats moyens de 30 incubations font apparaître que le dégazage possède un effet légèrement dépressif sur la synthèse du citrate (125 cpm contre 135) et du malate (155 cpm contre 180). Il a donc été abandonné.

Dans une dernière série d'expériences destinée à déterminer si la viscosité du latex pouvait être un frein aux échanges gazeux, nous avons comparé l'incorporation de C^{14}O_2 dans le citrate et le malate sur 1 ml de latex, 1 ml de sérum et 1 ml d'un homogénat de sérum et de culot (Tableau 19).

Tableau 19: INCORPORATION DE $C^{14}O_2$ DANS LE CITRATE ET LE MALATE SUR DIVERSES FRACTIONS DE LATEX

MILIEU	Radioactivité du citrate et du malate (cpm)			
	Exp. 1 m.v.: T-1		Exp. 2 m.v.: B-1	
	Citrate	Malate	Citrate	Malate
Latex	320	340	100	90
Sérum	490	540	160	180
Sérum + culot	60	100	60	40

La différence d'incorporation de la radioactivité entre le latex, milieu très visqueux, et le sérum, milieu très fluide, n'est pas très marquée. On est en droit de penser que les différences constatées sont moins dues à des vitesses de diffusion qu'au fait que les enzymes responsables de la carboxylation sont localisées dans la fraction sérum. Dans les études ultérieures, nous avons préféré utiliser le latex lui-même, afin d'être le plus près possible des conditions prévalant au sein des laticifères.

4 - Incubation de phosphate marqué au P^{32} sur latex

Nous avons utilisé des incubations de phosphate marqué au P^{32} sur le latex dans le but d'étudier son incorporation, soit dans les phosphoglucides, soit dans les composés phosphonucléotidiques énergétiques.

a) Méthode d'incubation utilisée

L'incubation est menée sur 5 ml de latex en utilisant de l'acide phosphorique marqué au P^{32} et sans entraîneur, en solution neutralisée par KOH à pH 7. La variation rapide de la radioactivité du P^{32} , par suite de sa courte période, fait que nous n'avons pas utilisé pour chaque expérimentation exactement le même nombre de microcuries de phosphate; en fait, nous nous sommes tenus à des quantités correspondant à une activité comprise entre 5 et 10 μCi (au moment de l'emploi) pour 5 ml de latex. L'incubation a été effectuée en tubes à essai, dans lesquels avait été au préalable lyophilisé le promoteur. Elle est menée à 30°C et dure de 30 minutes à 3 heures suivant l'expérimentation. Après l'incubation, le latex est coagulé dans la glace, par l'acide trichloracétique glacé, et le sérum obtenu est traité pour en extraire, soit les phosphoglucides par l'acétate de Ba, soit les composés phosphorylés énergétiques par fixation sur charbon (p. 44). Dans le premier cas, on effectue des chromatographies, puis des radiochromatographies, pour lesquelles le temps d'exposition est compris entre 6 et 48 heures. Dans le second cas, après hydrolyse du phosphore labile, la solution est dosée colorimétriquement et sa radioactivité est déterminée par comptage en phase liquide sur 25 ml de solution.

Aucune correction n'est apportée à la radioactivité en cpm, mais le rendement de l'incorporation dans le P.e.l. (*) est calculé en comparant l'activité trouvée dans celui-ci à l'activité introduite, mesurée au même moment et dans les mêmes conditions, sur une fraction aliquote.

* P.e.l.: Phosphore énergétique labile

b) Etude de divers facteurs d'influence

Nous avons étudié l'influence du temps d'incubation et de l'apport de substrat sur le dosage colorimétrique du P.e.l. en même temps que sur l'incorporation du P minéral marqué (Pm*) dans le P.e.l. Pour ce faire, nous avons fait varier le temps d'incubation du Pm* en présence ou non d'une quantité donnée de glucose ou d'acétate.

Tableau 20: INFLUENCE DU TEMPS D'INCUBATION ET DE L'APPORT DE SUBSTRAT SUR LE TAUX DE PHOSPHORE ENERGETIQUE LABILE (P.e.l) DU LATEX.

Substrat	Temps d'incubation	P.e.l. en mg % g de latex					
		Exp. 1 m.v.: P-1	Exp. 2 m.v.: B-2	Exp. 3 m.v.: B-2	Exp. 4 m.v.: W-3	Exp. 5 m.v.: T-1	Moyenne
NEANT	0	0,52	0,30	0,46	0,36	0,35	0,40
	15'	0,46	0,28	0,49	0,39	0,34	0,39
	30'	0,36	0,27	0,39	0,36	0,32	0,34
	60'	0,20	0,29	0,33	0,25	0,30	0,28
	120'	0,26	0,30	0,40	0,26	0,26	0,30
ACETATE 9.10 ⁻³ M	15'	0,38	0,31	0,50	0,45	0,31	0,35
	30'	0,33	0,29	0,36	0,37	0,30	0,33
	60'	0,25	0,28	0,35	0,26	0,29	0,28
	120'	0,21	0,31	0,39	0,09	0,28	0,26
GLUCOSE 3.10 ⁻³ M	15'	0,46	0,28	0,45	0,41	0,28	0,38
	30'	0,47	0,32	0,41	0,33	0,28	0,36
	60'	0,28	0,30	0,33	0,25	0,27	0,29
	120'	0,25	0,32	0,43	0,15	0,24	0,28

L'examen des résultats donnés dans le tableau 20 concerne seulement le dosage du P.e.l. Il apparaît en moyenne une décroissance marquée du taux de P.e.l. en fonction du temps. On peut songer à priori à l'attribuer à une libération de l'ATP-ase consécutive à une dégradation des lutoïdes (34). Remarquons que cette diminution est variable en fonction des latex; elle est faible ou très faible dans les expériences 3 et 2 et très marquée dans l'expérience 1. Il n'apparaît pas que l'apport de substrat (acétate ou glucose) possède un effet positif sur le taux de P.e.l. à un moment donné.

Les résultats du tableau 21 concernent le rendement de l'incorporation du Pm* dans le P.e.l.

Si l'on considère les résultats moyens, il apparaît que le rendement de l'incorporation décroît comme le P.e.l. en fonction du temps d'incubation. Des différences de comportement se font jour, là encore, entre les différents latex; ainsi, pour l'expérience 1, la chute est nette tandis que, pour l'expérience 2, il apparaît une augmentation assez nette.

L'apport de substrat ne possède pas ici non plus d'effet très accusé; remarquons toutefois que l'apport d'acétate entraîne systématiquement, pour toutes les expériences et pour le temps d'incubation minimum, une augmentation nette du rendement de l'incorporation. On peut expliquer cette opposition entre les résultats des 2 tableaux en tenant compte du fait que le dosage

colorimétrique rend compte de la quantité de P.e.l. à un moment donné et est donc en quelque sorte statique, tandis que le rendement de l'incorporation du P^{32} rend compte de l'échange entre le Pm^* et le P.e.l. et donc de l'intensité du renouvellement de celui-ci. On peut penser qu'une partie des substrats aurait été métabolisée augmentant ainsi le "turn over" du phosphore minéral.

Tableau 21: INFLUENCE DU TEMPS D'INCUBATION ET DE L'APPORT DE SUBSTRAT SUR LE RENDEMENT DE L'INCORPORATION DU PHOSPHATE MARQUE DANS LE P.e.l.

Substrat	Temps d'incubation	Rdt % incorporation de P^{32} dans le P.e.l.					
		Exp. 1 m.v.: P-1	Exp. 2 m.v.: B-2'	Exp. 3 m.v.: B-2	Exp. 4 m.v.: W-3	Exp. 5 m.v.: T-1	Moyenne.
NEANT	15'	4,4	1,5	5,2	3,2	3,1	3,5
	30'	3,7	2,1	3,7	3,5	3,0	3,2
	60'	1,5	2,2	3,3	2,0	2,8	2,3
	120'	1,4	2,2	4,8	1,4	2,5	2,5
ACETATE 9.10-3M	15'	4,8	1,9	6,1	4,7	3,5	4,2
	30'	3,9	1,9	3,8	4,1	3,1	3,4
	60'	1,7	2,4	3,4	1,6	2,8	2,4
	120'	1,3	2,6	3,9	1,9	2,9	2,5
GLUCOSE 3.10-3M	15'	4,4	1,8	5,5	3,9	2,4	3,6
	30'	4,2	2,3	3,8	3,1	2,5	3,2
	60'	1,3	2,7	2,7	0,9	2,3	2,0
	120'	1,4	3,1	4,5	0,7	2,2	2,4

La considération de l'influence du temps d'incubation et de l'effet réduit de l'apport de substrat nous a amenés à choisir assez arbitrairement un temps d'incubation de 30 minutes et à rejeter l'apport de substrat au latex avant incubation.

c) Etude de la reproductibilité de l'incubation

La valeur trouvée pour le coefficient de variabilité du rendement de l'incorporation du Pm^* dans le P.e.l. est de 10 %, ce qui peut être considéré comme satisfaisant pour une détermination de ce genre.

QUATRIEME PARTIE**RESULTATS EXPERIMENTAUX**

Notre travail a été consacré à la mise en évidence au sein du latex des mécanismes qui permettent, par la dégradation des glucides, de fournir le substrat acétate en même temps que l'énergie indispensable à la biogenèse du cis-poly-isoprène. A chaque fois que cela sera possible, nous tenterons de relier l'activité de ces divers groupes de réactions à la biogenèse du caoutchouc.

Nous examinerons donc tout d'abord l'éventualité de l'intervention de la glycolyse, puis les mécanismes aérobies qui oxydent totalement l'acétate tout en libérant une énergie importante.

A côté de ce métabolisme majeur, nous étudierons également les réactions de carboxylation, l'expérience ayant montré qu'elles pouvaient être, au moins dans certains cas, reliées à la biogenèse du caoutchouc.



I - LA CATABOLISME GLUCIDIQUE AU SEIN DU LATEX

A - INTRODUCTION

Nous avons vu dans l'historique que le latex contient une quantité relativement importante de différents glucides, susceptibles de variations importantes sous des influences diverses. Il était donc logique de rechercher si les phénomènes glycolytiques intervenaient au sein du latex. Rappelons que parmi toutes les enzymes liées à la glycolyse, seules l'aldolase (72) et la décarboxylase pyruvique (153) ont été décelées à ce jour.

B - MISE EN EVIDENCE D'UN CATABOLISME GLUCIDIQUE

Nous avons utilisé des dosages de glucides, des incubations de glucose marqué et l'action inhibitrice du fluorure de sodium pour déceler, dans nos conditions opératoires, la réalité d'un tel catabolisme.

1 - Disparition des glucides "in vitro"

Nous avons analysé sur des latex, récoltés dans les conditions standard définies précédemment, le taux de glucides immédiatement à la récolte, puis après 3 heures d'incubation à 30°C. Simultanément, nous avons dosé les acides volatils (V.F.A.) dont on connaît la liaison avec le développement microbien.

Tableau 22 : INFLUENCE DE 3 HEURES D'INCUBATION A 30°C.
SUR LE TAUX DE GLUCIDES ET LE V.F.A. DU LATEX.

Exp. n°	m.v.	GLUCIDES				V.F.A.			
		Avant	Après	Diff.	Δ	Avant	Après	Diff.	Δ
1	B-1	700	395	- 305	- 43	0,093	0,279	+ 204	+ 220
2	B-2	735	570	- 165	- 22	0,089	0,204	+ 115	+ 130
3	P-1	280	160	- 120	- 43	0,089	0,126	+ 37	+ 46
4	T-1	275	125	- 150	- 54	0,087	0,096	+ 9	+ 10
5	P-2	185	135	- 50	- 27	0,089	0,124	+ 35	+ 39
6	D-3	375	230	- 135	- 40	0,083	0,120	+ 46	+ 53

Le taux de glucides est exprimé en mg de glucose % g de latex et le V.F.A. en méq. % de latex.
m.v. : matériel végétal, voir codification (p. 35)

Diff : Différence

$$\Delta : 100 \frac{\text{Après}}{\text{Avant}} - 100$$

Le tableau 22 montre que, selon les cas, de 20 à 55 % des glucides présents dans le latex frais disparaissent en 3 heures d'incubation. L'examen des V.F.A. correspondants montre que l'on ne peut attribuer cette disparition aux bactéries; en effet, après 3 heures d'incubation, la valeur du V.F.A. est encore très faible et indique un développement microbien très limité correspondant à une période de latence du développement microbien comme cela a

été montré par ailleurs (174). Si l'on considère, par ailleurs, les précautions prises dans la récolte du latex et la faible augmentation du V.F.A. de ces latex, il apparaît extrêmement vraisemblable que la disparition des glucides puisse être attribuée au fonctionnement d'un système glycolytique (171).

2 - Incubation de glucose uniformément marqué

Nous avons ensuite incubé du glucose uniformément marqué dans du latex afin de préciser comment ce glucose était effectivement utilisé. La figure 19 montre un radiochromatogramme typique des acides organiques obtenu après incubation de 5 microcuries de glucose U-C¹⁴ par ml de latex. De nombreuses incubations effectuées sur des latex très divers, il ressort que les acides citrique et malique apparaissent systématiquement radioactifs, mais à des degrés divers selon les latex.

L'activité trouvée dans les acides citrique et malique peut être considérée comme une preuve de la réalité de la glycolyse dans nos conditions.

En effet, quelle que soit leur origine (schéma 1 ou 2), la présence du citrate et du malate implique au préalable la dégradation du glucose en pyruvate.

Nous devons noter que, dans ce type d'expérience, la dilution du glucose marqué introduite, par le glucose initialement présent dans le latex est de l'ordre de 1 à 1000. Il s'ensuit que la radioactivité, bien que faible dans le citrate et le malate, doit être considérée comme l'indice d'une forte activité glycolytique.

Schéma 1 :

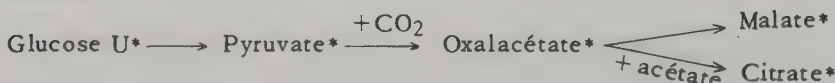
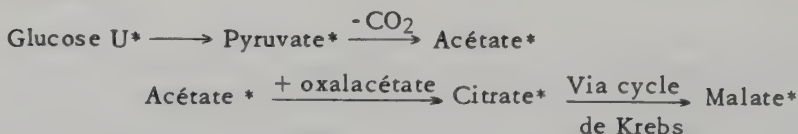


Schéma 2 :



3 - Inhibition de la glycolyse par le FNa

On sait (110) (189) que le fluorure de sodium inhibe la glycolyse au niveau de l'énolase et qu'il s'ensuit une accumulation d'acide phosphoglycérique (3-PGA). Nous avons tout d'abord étudié ce dernier phénomène puis l'influence du FNa sur l'apport d'énergie, sur la synthèse de divers acides organiques et enfin sur le rendement de la biosynthèse du caoutchouc à partir de l'acétate 2-C¹⁴.

a) Accumulation de 3-PGA sous l'influence du FNa

Nous avons effectué des incubations sur différents latex en présence de 1.10⁻²M de FNa; après coagulation trichloracétique, les esters phosphoriques, dont le sel de baryum est insoluble à pH 8,2, ont été séparés et chromatographiés. Il est apparu alors, sur les chromatographies provenant d'incubations en présence de FNa, un spot très net correspondant au 3-PGA; un tel spot était indétectable en l'absence de FNa.

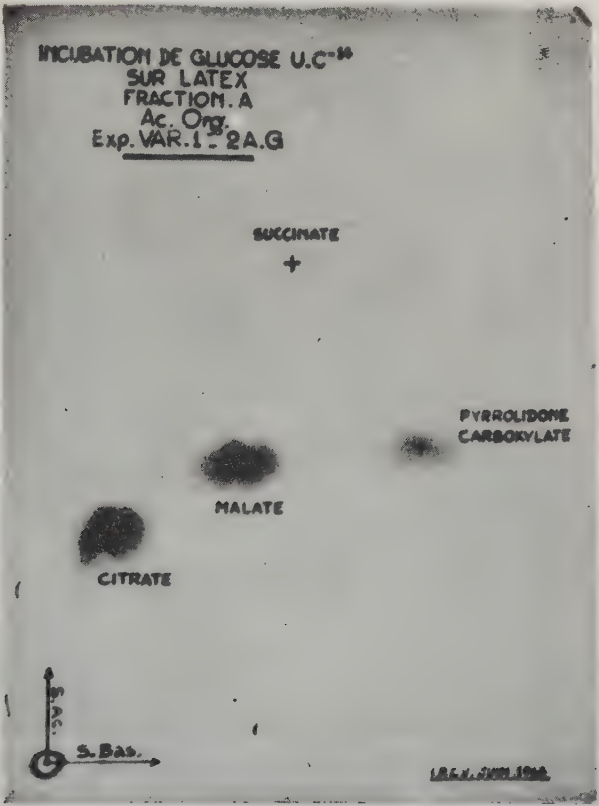


Figure 20 : INCUBATION DE GLUCOSE U-C¹⁴ SUR LATEX

La somme de la radioactivité incorporée dans les acides citrique et malique correspond à environ 1% de la radioactivité introduite (Incubation de 5 μ Ci de glucose U^{C14} par ml de latex, 3 heures à 30° C).

Nous avons repris cette expérimentation en incubant, cette fois, du phosphate minéral marqué (Pm*), en présence d'un taux croissant de FNa et en mesurant la radioactivité du 3-PGA sur les chromatogrammes, après incubation et séparation (fig. 20 - Tableau 23).

Tableau 23 : RADIOACTIVITE DU 3-PGA EN FONCTION DE L'INHIBITION DE LA GLYCOLYSE PAR FNa.

FNa Concentration N/L	Radioactivité du 3-PGA (cpm)	
	Expérience 1	Expérience 2
	m.v. : T-1	m.v. : B-1
0	50	180
1.10 ⁻⁴	200	1780
1.10 ⁻³	450	2300
5.10 ⁻³	520	4070
1.10 ⁻²	1220	4900

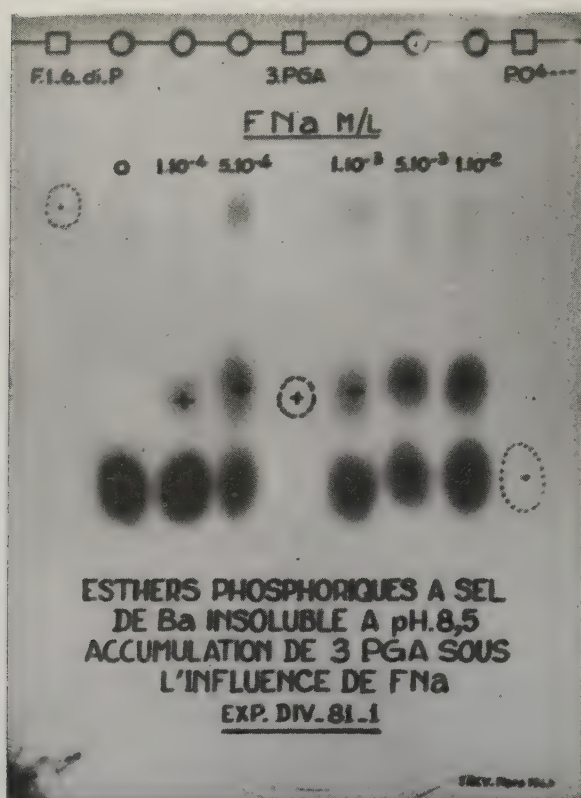


Figure 21: INFLUENCE DU FNa SUR L'ACCUMULATION DE 3 PGA*
APRES INCUBATION DE Pm*

L'accumulation de la radioactivité dans le 3-PGA en fonction du taux de FNa montre clairement que celui-ci agit effectivement en bloquant le fonctionnement de l'énolase.

b) Influence du FNa sur l'apport d'énergie

Dans une autre série d'expériences, nous avons recherché l'influence du FNa sur le taux de P.e.l. et sur l'incorporation du Pm* dans le P.e.l.

Les résultats reportés dans le tableau 24 font apparaître que le FNa réduit nettement la disponibilité en P.e.l. et plus fortement encore le renouvellement du P.e.l. à partir du Pm. On constate également une accumulation remarquable de la radioactivité du P minéral dans les esters glucidiques en général et dans le 3-PGA en particulier. Comme on pouvait s'y attendre, l'inhibition de la glycolyse par le FNa s'accompagne donc d'une réduction sensible de la disponibilité en liaisons énergétiques.

Tableau 26 : INHIBITION DE LA SYNTHÈSE DES ACIDES CITRIQUE ET MALIQUE MARQUÉS, APRES INCUBATION D'ACÉTATE 2-C¹⁴, EN PRESENCE DE FNa.

FNa Concentration M/L	Radioactivité des acides citrique et malique (cpm)			
	Exp. 1 - m.v. : B-1		Exp. 2 - m.v. : P-1	
	Citrique	Malique	Citrique	Malique
0	100	20	450	10
5.10 ⁻⁴	70	10	70	10
1.10 ⁻³	30	10	30	10
5.10 ⁻³	20	0	20	0
1.10 ⁻²	20	0	30	10

Le tableau 26 montre l'action dépressive très nette du FNa sur la radioactivité du citrate et du malate synthétisés "in vitro" à partir d'acétate 2-C¹⁴ sur 2 latex différents.

On peut songer en première approximation à attribuer cet effet dépressif à la réduction de la disponibilité en oxalacétate résultant du pyruvate par bêta-carboxylation.

d) Influence du FNa sur le rendement de la biosynthèse du caoutchouc à partir de l'acétate 2-C¹⁴

Dès l'instant où l'on apporte le substrat acétate nécessaire à la biogenèse du caoutchouc, on peut penser à priori que le fonctionnement de la glycolyse n'est plus indispensable à cette synthèse. En vue de le vérifier, nous avons effectué des incubations d'acétate 2-C¹⁴ sur divers latex en présence d'un taux croissant de FNa et en prenant cette fois comme critère le rendement de la transformation de cet acétate en caoutchouc marqué.

Tableau 27 : INFLUENCE DU FNa SUR LE RENDEMENT DE LA BIOSYNTHESE DU CAOUTCHOUC A PARTIR DE L'ACÉTATE 2-C¹⁴.

FNa Concentration M/L	Rdt de la transform. de l'acétate 2-C ¹⁴ en Cc(%)							
	Exp. 1 m.v. : B-1		Exp. 2 m.v. : T-3		Exp. 3 m.v. : M-1		Exp. 4 m.v. : P-1	
	Rdt	Δ	Rdt	Δ	Rdt	Δ	Rdt	Δ
0	13,6	-	0,4	-	11,0	-	21,5	-
5.10 ⁻⁴	10,8	- 20	0,4	0	7,1	- 35	2,9	- 86
1.10 ⁻³	1,9	- 86	0,3	- 25	4,6	- 58	2,0	- 90
5.10 ⁻³	2,0	- 85	0,3	- 25	3,3	- 70	1,7	- 92
1.10 ⁻²	2,5	- 82	0,4	0	2,7	- 75	1,7	- 92
5.10 ⁻²	1,5	- 89	0,4	0	2,4	- 78	1,4	- 93

Incubation de 5 μCi d'acétate 2-C¹⁴ par ml de latex (3 heures à 30° C)

$$\Delta = 100 \frac{\text{sans FNa}}{\text{+ FNa}} - 100$$

Le tableau 27 donne les résultats de cette expérimentation. Il apparaît, contrairement à ce que l'on pouvait imaginer, que le FNa possède un effet

dépressif remarquablement net sur la biogenèse du caoutchouc à partir de l'acétate. On constate que cette inhibition est d'autant plus intense que le rendement de la biosynthèse est élevé pour le motif témoin; ainsi, dans l'expérience 2 où le rendement est initialement très réduit, on ne constate pas d'effet dépressif du FNa sur celui-ci. On peut, en première approximation, interpréter ces résultats en admettant que la glycolyse peut être susceptible d'intervenir dans la biogenèse du caoutchouc, soit dans la régénération des cofacteurs, soit dans la synthèse des liaisons phosphorées énergétiques.

e) Expérience récapitulative

La dernière expérience montrant une liaison entre le fonctionnement de la glycolyse et la biogenèse du caoutchouc (résultats que l'on est en droit de trouver importants sur le plan pratique) nous a amenés à regrouper dans une expérience d'ensemble la plupart des résultats concernant le FNa mis précédemment en évidence. Dans cette expérience répétée sur 5 latex différents, nous avons déterminé l'influence du FNa :

- sur le rendement de la biosynthèse du caoutchouc à partir d'acétate 2-C^{14}
- sur la radioactivité des acides organiques après incubation d'acétate 2-C^{14} et de C^{14}O_2
- sur le taux de P.e.l. et le rendement de l'incorporation du Pm^* dans le P.e.l.

Les résultats présentés dans le tableau 28 confirment pleinement les conclusions précédentes :

- Le FNa inhibe puissamment la biogenèse du caoutchouc à partir d'acétate 2-C^{14} , dès 5.10^{-4}M .
- Il réduit considérablement la radioactivité incorporée dans le citrate et le malate à partir d'acétate 2-C^{14} aussi bien qu'à partir de C^{14}O_2 .
- Le taux de P.e.l. et le rendement de l'incorporation du Pm^* dans le P.e.l. sont fortement réduits par le FNa, mais à des degrés variables en fonction de leur valeur initiale.

Un examen détaillé des résultats du tableau 28 permet quelques remarques supplémentaires.

La possibilité d'un certain parallélisme, somme toute très logique, entre le dosage du P.e.l. et l'incorporation du Pm^* dans celui-ci se confirmerait à une inversion près.

On notera que le taux de P.e.l. le plus faible, comme le renouvellement du P.e.l. le plus réduit, correspondent au rendement de la biosynthèse du caoutchouc le plus faible (Exp. 2). La liaison entre P.e.l., son renouvellement et la biosynthèse du caoutchouc* n'est cependant pas très étroite, au moins dans nos conditions, comme le montrent les autres résultats.

Si l'on compare l'influence du taux de FNa sur les différents critères considérés, il apparaît que le seuil de l'inhibition, comme la progressivité de celle-ci, sont différents selon les critères :

- C'est ainsi que l'inhibition par le FNa du rendement de la biosynthèse du caoutchouc, nulle à 1.10^{-4}M , est très marquée à 5.10^{-4}M (78 %) et ne croît que faiblement par la suite pour atteindre 86 % à 1.10^{-2}M .

- Par contre, l'influence du FNa sur le taux de P.e.l. comme sur son renouvellement se fait sentir très progressivement dès la plus faible dose. De même la synthèse des acides citrique et malique marqués, tant à partir de l'acétate 2-C^{14} qu'à partir du C^{14}O_2 , est très progressivement inhibée par le FNa.

Rappelons que nous avons vu précédemment une accumulation de 3-PGA progressive, mais très nette dès 1.10^{-4}M et que le taux d'acides cétoniques est lui aussi très réduit dès 1.10^{-4}M .

C - DISCUSSION

La diminution du taux de glucides du latex durant les heures suivant la saignée, la transformation du glucose en citrate et malate et l'inhibition par le FNa ne laissent pas de doute quant au fonctionnement d'un catabolisme glucidique intense au sein du latex. L'accumulation de 3-PGA sous l'influence du FNa permet de plus d'affirmer qu'au moins dans ces dernières étapes, une partie importante des glucides en voie de dégradation utilise les étapes classiques du schéma d'EMBDEN-MEYERHOF.

Il apparaît que l'intensité de cette glycolyse, comme d'ailleurs le taux de glucides est très largement variable d'un latex à l'autre ainsi que nous l'avons vu dans le tableau 24. Il s'ensuit que l'inhibition par le FNa est, elle aussi, variable quelque soit le critère considéré. Cette variabilité de l'action du FNa peut s'expliquer également en tenant compte de résultats récents obtenus tant à la N.R.P.R.A. qu'à l'I.F.C. (129) (67). Il est en effet apparu, au moins dans certains cas, que le cycle des pentoses pouvait être effectif; on conçoit donc que l'efficacité du FNa soit liée à la possibilité qu'à un latex donné d'effectuer ou non, tout ou partie de la dégradation du glucose par la voie des pentoses phosphates. Une des conséquences particulièrement importante de cette inhibition est la réduction de la disponibilité en P.e.l.; c'est, à nos yeux, à cette réduction de l'énergie disponible qu'il faut attribuer l'action dépressive du FNa sur le rendement de la biosynthèse du caoutchouc à partir de l'acétate.

On voit donc apparaître dès maintenant la possibilité d'un facteur limitant de la biogenèse du caoutchouc. Ce n'est pas seulement par le substrat acétate que la glycolyse serait étroitement liée à la synthèse du cis-polyisoprène, mais aussi par la fourniture d'énergie qu'elle permet, soit à son niveau même, soit au niveau des cycles oxydatifs.

On peut toutefois se demander si l'action dépressive du FNa sur la biosynthèse du caoutchouc à partir de l'acétate ne résulte pas d'une action secondaire du FNa sur un des systèmes enzymatiques propres à la genèse du cis-polyisoprène.

1°- C'est ainsi que l'action inhibitrice du FNa sur l'acétyl-CoA-kinase a été montrée par KORKES notamment (104). Une telle inhibition est compatible avec la baisse d'activité constatée dans la synthèse du citrate (Tableau 28). Cette synthèse, quel que soit le substrat radioactif utilisé, est en effet tributaire de l'acétyl-CoA-kinase pour l'activation de l'acétate avant sa réaction sur l'oxalacétate.

Il faut toutefois remarquer que cette inhibition de la synthèse du citrate peut également s'expliquer par une réduction de la disponibilité en oxalacétate. Nous avons en effet montré une action dépressive très nette du FNa sur le taux d'acides cétoniques (Tableau 25). Nous croyons que cette explication est valable et nous donnerons 2 arguments en sa faveur.

- a) En incubant de l'acétate 2-C^{14} sur des dialysats, il apparaît qu'une dose aussi élevée que 1.10^{-2}M de FNa n'a pratiquement aucun effet sur le rendement de l'oxydation en C^{14}O_2 de cet acétate (Tableau 29). Or, quel que soit le processus d'oxydation de cet acétate, il est impossible que la première phase ne fasse pas intervenir l'acétyl-CoA-kinase, laquelle n'est pas, en l'occurrence, inhibée par 1.10^{-2}M de FNa.

Tableau 29 : INFLUENCE DU FNa SUR L'OXYDATION DE L'ACETATE 2-C^{14} EN C^{14}O_2 PAR UN DIALYSAT.

MOTIF	Rdt de l'oxydation en C^{14}O_2 (%)		
	Exp. 1 m.v. : W-7	Exp. 2 m.v. : P-2	Exp. 3 m.v. : B-2
Témoin	10,0	14,5	11,4
+ 1.10^{-2}M FNa	10,6	11,9	11,1
Incubation de $5\text{ }\mu\text{Ci}$ d'acétate 2-C^{14} par ml de dialysat (3 heures à 30°C .)			

- b) L'examen du tableau 28 montre que la synthèse de l'acide malique à partir de C^{14}O_2 est, elle aussi, fortement inhibée par FNa. Il est beaucoup plus vraisemblable que cet acide résulte du fonctionnement de l'enzyme malique de OCHOA (131) ou de la réduction de l'oxalacétate plutôt que d'un tour complet du cycle de Krebs, auquel cas cette synthèse ne dépend pas de l'acétyl-CoA-kinase.

Il ne semble donc pas que, dans nos conditions opératoires, cette première objection puisse être retenue.

2°- Une autre objection peut être faite si l'on tient compte d'un manque possible de spécificité du FNa et de son action éventuelle au niveau des composés phosphorylés ou pyrophosphatés intervenant dans la biosynthèse du caoutchouc (5-P-MVA, 5-PP-MVA, IPP). Nous disposons toutefois d'un argument à l'encontre de cette objection; en effet, FOURNIER (68) a pu montrer qu'une concentration de 1.10^{-2}M de FK en présence d'un système générateur de liaisons énergétiques (le G-6-P par la voie des pentoses) n'avait, dans le latex, aucun effet sur la synthèse du caoutchouc* à partir de MVA-2-C^{14} . Or c'est au delà du MVA qu'interviennent les composés phosphorylés dans la biosynthèse du caoutchouc; on est donc en droit d'arguer de ces résultats pour rejeter, jusqu'à preuve du contraire, l'hypothèse d'un manque de spécificité du FNa, au moins en l'occurrence.

Les expériences rapportées ici démontrent donc clairement l'existence d'un ou plusieurs systèmes glycolytiques au sein du latex et justifient expérimentalement les raisons que l'on pouvait avoir a priori de considérer ces systèmes comme un facteur important de la biogenèse du caoutchouc.



II. METABOLISME RESPIRATOIRE : LA DESMOLYSE DE L'ACETATE ET LES OXYDATIONS RESPIRATOIRES

A- INTRODUCTION

Il est maintenant bien connu que la transformation d'une molécule de glucose en 2 molécules de pyruvate est considérablement moins énergétique que l'oxydation ultérieure de ces 2 molécules de pyruvate en CO_2 . Rappelons en effet que la glycolyse fonctionnant en aérobiose permet la synthèse de 8 ATP par molécule de glucose, tandis que l'oxydation du pyruvate qui en résulte par les phénomènes respiratoires libère 30 molécules d'ATP, et que par ailleurs l'oxydation complète d'une molécule de glucose par la voie des pentoses libère l'équivalent de 36 ATP. Nous venons de voir que le fonctionnement de la glycolyse était lié à la biogenèse du caoutchouc par l'apport d'énergie, sans toutefois être à même de définir si cette énergie provenait de la glycolyse en elle-même ou de l'oxydation de l'acétate. Nous nous attacherons maintenant à déterminer si des processus oxydatifs se déroulent au sein du latex, et à définir les voies par lesquelles s'effectuent ces oxydations afin de déceler la part prise par ces phénomènes dans l'apport d'énergie au niveau des laticifères.

B- MISE EN EVIDENCE DU METABOLISME RESPIRATOIRE

Nous tenterons de mettre en évidence le fonctionnement de la respiration tout d'abord sur latex, donc en fait dans les conditions les plus naturelles. Par la suite, un certain nombre de contingences nous amèneront à l'étudier sur un latex privé de son caoutchouc et dialysé.

1- La respiration sur latex

Nous avons vu dans la partie historique que peu de travaux avaient été effectués dans le passé sur la respiration du latex. Les mesures d'oxygène et de gaz carbonique sont, par ailleurs, difficiles à relier à la respiration par suite d'une absorption d'oxygène faible due surtout au fonctionnement des poly-phénol-oxydases (p.p.ox.) et d'un dégagement de gaz carbonique intense conduisant à des quotients respiratoires de l'ordre de 10 (80) (174).

Nous avons repris une expérience de Van den TEMPEL (174) consistant à déterminer l'influence d'un apport d'acétate sur l'absorption d'oxygène et le dégagement de gaz carbonique. Nous nous sommes toutefois contentés de mesurer l'absorption d'oxygène.

Le tableau 30 confirme les travaux antérieurs : aux concentrations utilisées, ni le glucose, ni l'acétate n'ont d'effet remarquable sur l'absorption d'oxygène. On peut penser que cela est dû au fait que les quantités de ces substrats normalement présentes dans le latex sont telles qu'elles ne constituent pas un facteur limitant de l'intensité respiratoire (I.R.) Quoiqu'il en soit, cette méthodologie ne permet pas de déceler sur latex le fonctionnement de la desmolyse.

Tableau 30 : INFLUENCE DE L'APPORT D'ACETATE ET DE GLUCOSE SUR L'ABSORPTION D'OXYGENE PAR UN LATEX.

MOTIF	Absorption d'O ₂ (μl / 3 heures / ml latex)		
	Exp. 1 m.v. : T-1	Exp. 2 m.v. : P-1	Exp. 3 m.v. : B-2
Témoin	80	50	75
ACETATE			
2.10 ⁻³ M	85	50	70
1.10 ⁻²	65	45	70
2.10 ⁻²	75	50	70
GLUCOSE			
2.10 ⁻³ M	95	45	75
1.10 ⁻²	65	50	75
2.10 ⁻²	95	50	80

Rappelons d'autre part que, lors de l'étude critique de la méthode d'incubation du Pm* dans le latex, nous avons suivi les variations du P.e.l. sous l'influence du temps avec ou sans apport de substrat. Les résultats analysés alors sur un plan différent peuvent être considérés à nouveau. On a vu dans les tableaux 20 et 21 que l'apport de substrat (acétate et glucose) n'avait pas d'action positive sur le taux de P.e.l. dosé à un moment donné, mais que, par contre, il apparaissait dans certains cas un effet positif, léger mais cependant réel, de l'apport de substrat sur la radioactivité incorporée dans le P.e.l. Si le dosage colorimétrique du P.e.l. est purement statique, le rendement de l'incorporation du Pm* dans le P.e.l. peut être considéré, par contre, comme rendant compte du renouvellement de ce dernier. Il faut sans doute voir dans une rotation plus intense du Pm*, après addition de substrat, l'indice d'une utilisation faible mais réelle des substrats introduits et donc d'une certaine phosphorylation.

Dans un autre type d'expérimentation, nous avons incubé de l'acétate 2-C¹⁴ sur latex au manomètre WARBURG et déterminé la radioactivité du C¹⁴O₂ libéré par l'oxydation complète de cet acétate.

L'examen du tableau 31 montre que, dans les 4 expériences citées, le rendement de l'oxydation de l'acétate 2-C¹⁴ en C¹⁴O₂ ne dépasse pas 4 %. Au cours d'autres expériences non citées ici, nous n'avons jamais obtenu un rendement supérieur à 5 %.

Tableau 31 : OXYDATION DE L'ACETATE 2-C¹⁴ EN C¹⁴O₂ PAR INCUBATION AU WARBURG SUR LATEX FRAIS.

Exp. 1 m.v. :	Exp. 2 m.v. :	Exp. 3 m.v. :	Exp. 4 m.v. :
1,5 %	4,0 %	1,2 %	0,1 %
Incubation de 5 μCi d'acétate 2-C ¹⁴ par ml de latex, soit une concentration de 5.10 ⁻⁴ M en acétate (3h. à 30°C)			

Ces 2 dernières séries d'expériences sont donc en faveur d'une faible activité desmolytique au sein du latex frais. Le niveau particulièrement bas des oxydations, comme les contingences citées précédemment quant à l'absorption d'oxygène et au dégagement de gaz carbonique, interdisent pratiquement sur le latex complet l'emploi des méthodes classiques pour l'étude de ce phénomène.

On peut toutefois faire remarquer à propos de la dernière expérience, comme on l'a noté précédemment à propos des incubations de glucose (p. 64), que la présence au sein du latex d'une quantité importante de citrate et de malate est, à priori, susceptible de bloquer dans le pool citrate-malate une part très importante du citrate et du malate radioactifs synthétisés "de novo" à partir de l'acétate 2-C^{14} . Il est évident qu'il s'ensuivra une dilution considérable du citrate et du malate radioactifs, laquelle réduira d'autant leur oxydation en C^{14}O_2 et donc finalement celle de l'acétate 2-C^{14} .

C'est afin de lever toutes les objections concernant la dilution du substrat par les composés naturellement présents dans le latex que nous avons par la suite étudié les oxydations sur un latex dialysé.

2- La desmolyse de l'acétate sur dialysat

Dans ces expériences, nous avons utilisé un latex privé de sa phase caoutchouc par ultracentrifugation et dialysé. Il est apparu rapidement qu'en incubant de l'acétate 2-C^{14} sur dialysat et en déterminant la radioactivité du C^{14}O_2 libéré, il était possible de mettre en évidence une oxydation importante, mais variable, de l'acétate en C^{14}O_2 .

Tableau 32 : INFLUENCE DE LA DIALYSE SUR LE RENDEMENT DE L'OXYDATION DE L'ACETATE 2-C^{14} EN C^{14}O_2

Expérience n°	Avant dialyse	Après dialyse
1	4,0 %	50,8 %
2	0,9	58,9
3	0,2	32,0
4(*)	1,1	25,3
5(*)	1,0	24,3
Incubation de 5 μCi d'acétate 2-C^{14} par ml de dialysat (3 heures à 30° C.)		
(*) Incubation 2,5 μCi d'acétate*.		

Les résultats du tableau 32 font état de l'influence de la dialyse sur l'oxydation de l'acétate 2-C^{14} et permettent de conclure à l'existence d'une certaine desmolyse de l'acétate sur latex dialysé.

a) Influence du gaz carbonique sur la desmolyse de l'acétate

Afin de déterminer l'influence possible du gaz carbonique sur l'intensité de la desmolyse, nous avons comparé l'oxydation de l'acétate 2-C^{14} sur dialysat, en effectuant l'incubation, d'une part au WARBURG en présence de KOH et d'autre part, en tube à essai bouché. Dans le premier cas, le gaz carbonique initialement présent, ou se formant au cours de la manipulation, est fixé au fur et à mesure par KOH. Dans le deuxième cas, le gaz carbonique est

récupéré en fin d'incubation après acidification du milieu au moyen d'un dispositif approprié. Il apparaît une différence hautement significative (H.S.) entre l'intensité de l'oxydation de l'acétate déterminée au WARBURG (rendement : 36,8 %) ou en tube à essai (rendement : 2,3 %)

Il est curieux de constater qu'en tube bouché, le rendement de l'oxydation de l'acétate 2-C^{14} en C^{14}O_2 est du même ordre de grandeur que celui obtenu sur latex frais ou sur un homogénat sérum-culot non dialysé, après incubation au WARBURG. On est en droit de se demander si le dégagement intense de gaz carbonique se produisant dans le latex ne maintient pas, au voisinage des enzymes responsables de l'oxydation de l'acétate, une pression partielle de gaz carbonique suffisante pour inhiber, au moins partiellement, l'oxydation de cet acétate et ce, même lorsque l'incubation est effectuée au WARBURG, en présence de KOH dans la cupule centrale.

b) Influence de l'élimination du citrate et du malate sur l'oxydation de l'acétate.

C'est l'hypothèse d'une dilution du promoteur radioactif par divers intermédiaires de son oxydation qui nous a précédemment amenés à utiliser la dialyse. Nous avons déterminé ici l'influence sur le rendement de l'oxydation de l'acétate 2-C^{14} de l'apport de citrate et de malate, en quantités variables et au plus égales à celles présentes dans le milieu avant dialyse.

Tableau 33 : INFLUENCE DE L'APPORT D'UN MELANGE DE CITRATE ET MALATE SUR LE RENDEMENT DE L'OXYDATION DE L'ACETATE 2-C^{14} EN C^{14}O_2 AU SEIN D'UN DIALYSAT.

CITRATE et MALATE % de la quantité avant dialyse	Rdt de l'oxydation acétate* en C^{14}O_2 (%)			
	Exp. 1 m.v. : B-2	Exp. 2 m.v. : P-1	Exp. 3 m.v. : B-3	Exp. 4 m.v. : W-1
0	40	21	30	33
25 %	31	19	22	27
50 %	24	20	22	27
75 %	24	20	22	27
100 %	21	19	24	27
Incubation de $2,5 \mu\text{Ci}$ d'acétate 2-C^{14} par ml de dialysat (3 heures à $30^\circ\text{C}.$)				

Dans l'expérience dont les résultats figurent au tableau 33, nous avons ajouté à 4 dialysats provenant de latex différents des quantités de citrate et de malate représentant 0-25-50-75 et 100 % de la quantité de ces 2 acides dosés avant dialyse. Il apparaît que l'apport de ces 2 acides possède, dans 3 cas sur 4, un effet dépressif, d'intensité variable, sur l'oxydation de l'acétate. On remarque cependant que cet apport en quantité équivalente à celle présente initialement ne ramène pas le rendement de l'oxydation de l'acétate aux valeurs trouvées habituellement sans dialyse. La faible oxydation constatée par incubation d'acétate 2-C^{14} , sur latex ou sur sérum-culot non dialysé, ne saurait donc être uniquement consécutive à une compétition isotopique au niveau du citrate et du malate.

Il faut remarquer cependant que la compétition isotopique au niveau citrate-malate est bien réelle, sinon d'importance majeure; on peut s'en rendre compte en considérant la radioactivité qui s'accumule dans les chromatogrammes au niveau du citrate et malate, lorsqu'on ajoute ceux-ci à un dialysat (Tableau 34).

Tableau 34 : INFLUENCE DE L'APPORT DE CITRATE ET MALATE SUR LA RADIOACTIVITE DE CES MEMES ACIDES APRES INCUBATION D'ACETATE 2-C¹⁴ SUR DIALYSAT.

CITRATE et MALATE % de la quantité avant dialyse	Exp. 1 m.v. : B-2		Exp. 3 m.v. : B-3		Exp. 4 m.v. : W-1	
	Citr. cpm	Malate cpm	Citr. cpm	Malate cpm	Citr. cpm	Malate cpm
0	10	15	25	5	20	15
25 %	10	10	30	20	90	60
50 %	170	25	60	25	100	55
75 %	150	25	60	30	-	-
100 %	170	35	60	35	115	40

Incubation de 2,5 μ Ci d'acétate 2-C¹⁴ par ml de dialysat (3 heures à 30°C.)

c) Influence du pH sur l'oxydation de l'acétate par un dialysat

JAMES (97) admet que, généralement, la respiration est relativement insensible à l'abaissement du pH jusqu'à 4,5. Nous avons tenté de vérifier ce point en dialysant des fractions d'un même homogénat culot-sérum contre des tampons phosphates 0,02 M de pH 4-5-6-7; nous avons choisi comme critère l'absorption d'oxygène et le rendement de l'oxydation de l'acétate.

Précisons que cette expérimentation n'est pas parfaite, tant par suite de la variabilité apportée par la dialyse qu'à cause de difficultés pratiques résultant de la nécessité de mener 4 dialyses de front.

Tableau 35

pH de dialyse et d'incubation	Exp. 1 m.v. : B-1		Exp. 2 m.v. : W-1		Exp. 3 m.v. : B-3		Exp. 4 m.v. : T-1		MOYENNES	
	O ₂ (*)	CO ₂ (**)	O ₂	CO ₂	O ₂	CO ₂	O ₂	CO ₂	O ₂	CO ₂
pH 4	480	77	480	75	480	77	440	66	470	74
pH 5	960	61	730	62	920	61	650	56	810	60
pH 6	1040	54	1150	57	1010	57	1400	-	1150	61
pH 7	1110	57	1150	68	-	54	1250	62	1120	60

Incubation de 5 μ Ci d'acétate 2-C¹⁴ (0,5 micromol.) par ml de dialysat (3 heures à 30°C.)

(*) Absorption d'oxygène en μ l pour 3 heures d'incubation et par ml de dialysat.

(**) Rendement de l'oxydation de l'acétate 2-C¹⁴ en C¹⁴O₂ (%)

On constate (Tableau 35) que la réduction du pH a un effet dépressif très net sur l'absorption d'oxygène; ce résultat confirme en les étendant ceux de HSIA (80). Cette réduction est due vraisemblablement à une action du pH sur le fonctionnement des poly-phénol-oxydases.

Il apparaît que la réduction du pH entraîne, par contre, un effet positif assez net sur le rendement de l'oxydation de l'acétate; rappelons à ce propos que TURNER et HANLEY (180) purent également déceler une augmentation de l'I.R. des tranches de carottes en abaissant le pH. Ces auteurs l'attribuèrent toutefois au fait qu'en abaissant le pH, le succinate, qu'ils utilisèrent comme substrat, était moins dissocié et qu'il pouvait donc plus aisément pénétrer les centres actifs des cellules. Une telle explication ne saurait convenir dans nos conditions où le problème de la perméabilité cellulaire ne doit pas se poser. Quoiqu'il en soit, il est remarquable de constater, dans notre expérimentation, le découplage entre l'absorption d'oxygène et l'oxydation de l'acétate 2-C^{14} en C^{14}O_2 .

d) Influence de l'apport de substrat sur l'absorption d'oxygène par les dialysats

A ce point des travaux, nous avons repris une expérience précédemment réalisée sur latex complet afin de déterminer si, sur dialysat, il était possible en utilisant des doses plus importantes de substrat de déceler une augmentation de l'absorption d'oxygène.

L'expérience décrite dans le tableau 36 a été réalisée sur 3 dialysats différents en utilisant les mêmes doses d'acétate et de glucose que dans l'expérience précédente.

Tableau 36

MOTIF	Absorption d' O_2 (μl /3 heures/ml dialysat)		
	Exp. 1 m.v. : T-1	Exp. 2 m.v. : P-1	Exp. 3 m.v. : B-2
TEMOIN	940	1095	1025
ACETATE			
2.10^{-3} M	900	1110	1020
1.10^{-2}	900	1075	950
2.10^{-2}	850	1125	1065
GLUCOSE			
2.10^{-3} M	950	1050	1010
1.10^{-2}	1000	1090	1080
2.10^{-2}	1050	1110	1025

Il apparaît, là encore, que l'apport de substrat, acétate ou glucose, n'influe pas de façon sensible sur l'absorption d'oxygène. En effet, l'absorption due aux p.p.ox. masque totalement celle liée à l'oxydation des substrats introduits. On est amené à rejeter, dans nos conditions, les mesures d'absorption d'oxygène en tant que critère des oxydations. Ce point de vue est à rapprocher de celui de FREEBAIRN & REMMERTT (69) qui, par des mesures d'absorption d'oxygène conjuguées à des mesures de gaz carbonique et de C^{14}O_2 , ont montré, sur des mitochondries, que l'absorption d'oxygène ne saurait toujours rendre compte de l'oxydation du substrat introduit, par suite de la possibilité d'une absorption résultant de l'oxydation de substrats endogènes.

3 - Discussion

On a pu constater au cours de cette expérimentation qu'il était beaucoup plus malaisé de déceler au sein du latex une activité respiratoire qu'une activité glycolytique. Les expériences citées tendent à montrer néanmoins l'existence d'une très faible activité respiratoire sur latex. En opérant sur dialysat et au WARBURG, nous avons pu cependant déceler une desmolyse de l'acétate représentant 10 à 20 fois celle mise en évidence sur latex.

On a vu également que les enzymes respiratoires du dialysat, et à fortiori du latex, n'étaient pas susceptibles de consommer une grande quantité de substrat. Il faut admettre qu'un ml de dialysat est en moyenne apte à oxyder en gaz carbonique 0,5 micromol. d'acétate en 3 heures avec un rendement moyen de 50 %. La dernière expérience citée impliquant de 2 à 20 micromol. n'a pas permis de déceler une augmentation de l'absorption d'oxygène. Nous pouvons donc admettre que les enzymes permettant l'oxydation complète de l'acétate sont présentes au sein du latex; cependant, leur potentiel d'oxydation paraît limité. Si l'on se rappelle l'influence dépressive très marquée du gaz carbonique sur la respiration d'un dialysat, on est amené à voir dans la très forte pression partielle de gaz carbonique présente dans le latex, comme au sein des laticifères, une des raisons de la faible activité respiratoire du latex.

Quoiqu'il en soit, l'emploi de la dialyse nous a permis de mettre en évidence une respiration limitée, mais réelle, relativement indépendante du pH. Dans la suite de ces travaux, nous utiliserons la dialyse comme un outil pour étudier le métabolisme respiratoire, tel qu'il pourrait fonctionner dans le latex.

C - ACTION DES INHIBITEURS DES OXYDATIONS RESPIRATOIRES

Ayant pu précédemment déceler l'existence d'une certaine respiration au sein du latex, nous chercherons maintenant à la caractériser en utilisant les inhibiteurs généraux des oxydations respiratoires. Nous tenterons notamment de déterminer si les poly-phénol-oxydases (p.p.ox.), dont nous avons vu l'importance, au moins sur le plan quantitatif, jouent un rôle en tant qu'oxydases terminales, à côté ou à la place de la chaîne des cytochromes dont l'activité est maintenant plus couramment admise dans le domaine végétal, HILL & HARTREE (78).

A ces fins, nous utiliserons des inhibiteurs classiques tels l'acide cyanhydrique et l'oxyde de carbone, un inhibiteur plus spécifique des oxydases cupriques (DIECA), des inhibiteurs plus spécifiques des oxydases ferriques (o.phénantroline, α - α 'dipyridyle) et un découpleur de la phosphorylation oxydative (2-4-DNP).

1 - L'acide cyanhydrique

Nous avons utilisé le cyanure selon la technique de ROBBIE (149) qui consiste à employer des combinaisons de $(\text{CN})^2\text{Ca}$ et de $(\text{HO})^2\text{Ca}$ dans la cupule centrale de la fiole de façon à libérer une quantité donnée de CNH dans le milieu réactionnel et à permettre en même temps la récupération du CO_2 .

Dans la première expérimentation, les incubations ont été faites sur latex dialysé et nous avons pris comme critères de l'inhibition le rendement de l'oxydation de l'acétate 2-C^{14} en caoutchouc et l'absorption d'oxygène. Les résultats de cette expérimentation figurent au tableau 37. Il apparaît que le CNH est remarquablement efficace pour inhiber l'oxydation de l'acétate comme l'absorption d'oxygène.

Tableau 37 : ETUDE DE L'INHIBITION PAR CNH SUR DIALYSAT

CNH Concentration M/L	Exp. 1 m.v. : B-1				Exp. 2 m.v. : P-1			
	O ₂ (*)	CO ₂ (**)		Succin. cpm	O ₂ (*)	CO ₂ (**)		Succin. cpm
		Rdt	Δ			Rdt	Δ	
0	470	26	-	25	560	33	-	35
1.10^{-4}	390	19	- 27	20	460	25	- 25	35
5.10^{-4}	140	4,9	- 81	155	160	3,8	- 84	545
1.10^{-3}	90	1,5	- 94	145	85	0,6	- 98	445
5.10^{-3}	70	1,3	- 95	15	0	0,1	- 99	100
1.10^{-2}	80	0,8	- 97	10	0	0,1	- 99	80

Incubation de $5 \mu\text{Ci}$ d'acétate 2-C^{14} par ml de dialysat (3 heures à $30^\circ\text{C}.$)
 (*) Absorption d'oxygène en $\mu\text{l/ml}$ / 3 heures d'incubation
 (**) Rendement de l'oxydation de l'acétate 2-C^{14} en C^{14}O_2 (%).

On remarquera également une action systématique de CNH sur la radioactivité incorporée dans l'acide succinique. Il apparaît, entre 5.10^{-4} et 1.10^{-3} , une accumulation d'acide succinique; au delà de cette dose, l'absence d'action peut être attribuée à des effets secondaires. L'expérience a montré que seul, cet acide subissait l'influence de CNH.

Dans une autre série d'expériences, nous avons utilisé un homogénat sérum-culot non dialysé et nous avons considéré cette fois, en plus de l'oxydation de l'acétate 2-C^{14} en C^{14}O_2 , sa transformation en caoutchouc radioactif. Il a été ainsi possible de travailler au WARBURG sur un liquide moins visqueux que le latex tout en mesurant cependant la biosynthèse du caoutchouc*. (*)

Il ressort du tableau 38 que, dans ces conditions, le CNH diminue nettement la faible oxydation d'acétate marqué en C^{14}O_2 et inhibe encore plus fortement le rendement de la transformation en caoutchouc radioactif. On remarquera accessoirement que, sur sérum-culot non dialysé, le CNH possède un effet dépressif net sur la synthèse "de novo" du citrate et de l'acide β -hydroxy- β -méthyl-glutarique (HMG).

(*) Il a suffi de rajouter au milieu, en fin d'incubation, une certaine quantité de latex entraîneur pour pouvoir rassembler le caoutchouc* formé pendant l'expérience.

Tableau 38 : ETUDE DE L'INHIBITION PAR CNH SUR
SERUM-CULOT NON DIALYSE.

CNH Concentration M/L	Exp. 1 m.v. : B-1		Exp. 2 m.v. : T-1		Exp. 3 m.v. : P-2	
	CO ₂ (*)	BS (**)	CO ₂	BS	CO ₂	BS
0	0,5	2,8	0,5	6,5	1,2	2,2
1.10 ⁻⁴	0,4	-	0,3	5,2	0,5	1,3
5.10 ⁻⁴	0,3	0,5	0,2	1,1	0,2	0,6
1.10 ⁻³	0,3	0,6	0,2	0,8	0,1	0,3
5.10 ⁻³	0,3	0,2	0,2	0,1	-	0,1
1.10 ⁻²	0,3	0,1	0,2	0,1	0	0,1
Incubation de 5 μ Ci d'acétate 2-C ¹⁴ par ml de sérum-culot (3 heures à 30°C.)						
(*) Rendement de l'oxydation de l'acétate 2-C ¹⁴ en C ¹⁴ O ₂ (%)						
(**) Rendement de la transformation de l'acétate 2-C ¹⁴ en Cc*						

Nous avons pu montrer précédemment l'existence d'un découplage entre l'absorption d'oxygène et l'oxydation de l'acétate 2-C¹⁴ en C¹⁴O₂. Il est très vraisemblable que l'action spectaculaire de CNH sur l'absorption d'oxygène soit en l'occurrence consécutive à son activité vis-à-vis des p.p.ox. Rappelons que HSIA avait déjà mis en évidence une telle action (80).

L'inhibition du métabolisme respiratoire étant quasi totale entre 1.10⁻³ et 1.10⁻² M de CNH, nous pouvons en conclure en nous référant à JAMES (97) que, dans nos conditions, tous les systèmes oxydasiques terminaux sont liés à un groupement prosthétique métallique.

La polyvalence de CNH vis-à-vis de 3 des principaux systèmes oxydasiques terminaux (cytochrome-oxydase, p.p.ox. et ascorbique-oxydase) (97) ne permet pas de définir la nature du système sur lequel il agit. On peut toutefois remarquer, si l'on considère le pH du milieu d'incubation (pH 7) et le pK de l'acide cyanhydrique (pK 8,9), qu'il est totalement non dissocié dans nos conditions et qu'il réagit donc, entre autres, sur la cytochrome oxydase, à l'exclusion de la ferricytochrome C et des cytochromes du groupe B. En effet, HORECKER & STANNARD (79) ont montré que la forme non dissociée de CNH était active vis-à-vis de la cytochrome oxydase, tandis que la cytochrome C ne réagissait qu'à la forme dissociée (79) (166). Il est connu, par ailleurs, que les cytochromes B sont insensibles au CNH (115).

Remarquons que l'action du CNH sur l'accumulation d'acide succinique dans une certaine gamme de concentration est également en faveur de la présence de la cytochrome oxydase, car on ne connaît pas d'autre chaîne que celle des cytochromes pour promouvoir l'oxydation du succinate (78).

L'effet dépressif de CNH, lors des incubations sur sérum-culot non dialysé, vis-à-vis de la synthèse du citrate, du HMG et du caoutchouc est à remarquer sans qu'il soit possible de préciser si ces inhibitions résultent de la réduction de l'énergie disponible ou d'une action secondaire sur des systèmes particuliers.

2 - L'oxyde de carbone

L'oxyde de carbone est un inhibiteur des enzymes respiratoires qui, comme CNH, agit en formant un complexe avec le fer ou le cuivre des oxydases (97). Toutefois, il est bien connu que le complexe formé est stable à la lumière pour les oxydases cupriques et instable pour les oxydases ferriques (188). Nous tenterons ici de mettre à profit cette propriété très largement utilisée dans le passé par de nombreux auteurs.

Nous inspirant des recommandations d'UMBREIT (181), nous avons effectué un certain nombre de mesures de respiration sous diverses atmosphères : normale (N_2 : 80 - O_2 : 20), appauvrie en oxygène (N_2 : 95 - O_2 : 5) et riche en oxyde de carbone (CO : 95 - O_2 : 5); nous avons préparé nous-mêmes ces mélanges gazeux et le dernier a été utilisé d'une part à la lumière et, d'autre part, à l'obscurité. L'absorption d'oxygène et l'oxydation de l'acétate $2-C^{14}$ en $C^{14}O_2$ ont été utilisées comme critères.

Le tableau 39 donne les résultats de cette expérimentation; considérons tout d'abord l'absorption d'oxygène :

- L'absorption d'oxygène est réduite en moyenne de 25 % quand on passe de l'air à un milieu 4 fois plus pauvre en oxygène.
- Le pourcentage d'inhibition à la lumière est constant pour les divers latex et se situe entre 70 et 80 %.
- Il n'apparaît que peu de variations dans l'inhibition de l'absorption d'oxygène quand on compare les incubations effectuées à la lumière et à l'obscurité. L'inhibition est dans l'ensemble légèrement plus faible à la lumière.
- L'absorption d'oxygène n'est jamais inhibée totalement par CO , puisqu'elle représente en moyenne 75 % de celle sous atmosphère normale et 66 % de celle sous atmosphère appauvrie en O_2 .

Si l'on considère maintenant le rendement de l'oxydation de l'acétate on voit que :

- La réduction de la teneur en oxygène de l'atmosphère d'incubation entraîne une baisse d'environ 10 % de la desmolyse.
- Le pourcentage d'inhibition par le CO à la lumière se situe entre 80 et 95 % par rapport à l'atmosphère normale, à une exception près où l'inhibition est beaucoup plus réduite (50 %).
- L'oxydation déterminée à l'obscurité est systématiquement plus inhibée par CO qu'à la lumière; cependant, comme pour l'inhibition de l'absorption d'oxygène, les différences sont peu marquées.

On trouve en moyenne une inhibition de 82 % à la lumière et de 89 % à l'obscurité lorsqu'elle est exprimée par rapport à l'atmosphère normale, et de 80 et 88 % par rapport à l'atmosphère appauvrie en oxygène.

Tableau 39 : INHIBITION PAR L'OXYDE DE CARBONE
résultat moyen de 6 expériences.

Atmosphère d'incubation	Absorption d'O ₂ (*)		Rdt Oxydation (**)	
	μl	Δ	%	Δ
normale	775	-	51	-
O ₂ - N ₂ (5-95)	572	- 26	47	- 8
O ₂ - CO (5-95) lumière	198	- 74	9,3	- 82
O ₂ - CO (5-95) obscurité	180	- 77	5,5	- 89
Incubation de 5 μCi d'acétate 2C ¹⁴ par ml. de dialysat (3 heures à 30° C.)				
(*) Absorption d'O ₂ en μl par ml de dialysat en 3 heures.				
(**) Rendement en %, de l'oxydation de l'acétate 2-C ¹⁴ en C ¹⁴ O ₂ .				

Remarquons enfin incidemment que l'inhibition par le CO a entraîné des accumulations parfois remarquables de la radioactivité dans le succinate.



Il apparaît, en examinant l'inhibition de l'absorption d'oxygène par CO, que celle-ci n'est jamais totale, puisqu'elle ne représente en moyenne que 66 % du témoin. On pourrait penser en première approximation que l'absorption d'oxygène ne dépend pas des oxydases à groupement prosthétique métallique et que cette absorption serait donc le fait d'enzymes autoxydables insensibles au CO. En fait, si l'on se rappelle d'une part, l'expérimentation avec CNH qui a mis en évidence que la totalité des oxydations terminales nécessitait la présence de groupements métalliques et d'autre part, les travaux antérieurs (74) (80) (174) montrant la présence d'un potentiel élevé d'activité polyphénolxydasique, on est amené à rejeter cette façon de voir. Il semble beaucoup plus vraisemblable que l'inhibition des poly-phénol-oxydases a été, en l'occurrence, incomplète par suite, par exemple, d'un gros excès de ces enzymes ou d'un déplacement des équilibres entre les divers systèmes.

Si l'on considère l'oxydation de l'acétate, on constate que l'inhibition n'est pas non plus complète (80-88 % en moyenne). Doit-on, là encore, attribuer ce fait à une inhibition imparfaite plutôt que le considérer comme la preuve d'une respiration résiduelle indépendante de CO et consécutive à un déplacement d'équilibre entre divers mécanismes ?

On remarquera un certain décalage dans l'inhibition selon que l'on considère l'un ou l'autre des critères utilisés; l'absorption d'oxygène est relativement moins touchée (66-68 %) que l'oxydation de l'acétate (81-88 %). Ce décalage est attribuable au découplage déjà mis en évidence entre l'absorption d'oxygène et l'oxydation de l'acétate.

La faible différence entre les inhibitions à la lumière et à l'obscurité est à remarquer. On peut évidemment songer à un éclairage inadéquat entraînant une levée imparfaite de l'inhibition des enzymes ferriques; précisons que

nous avons utilisé diverses combinaisons d'éclairage qui nous ont toutes donné des résultats pratiquement équivalents. On serait donc porté à croire qu'une part réduite des oxydations terminales passerait par la cytochrome oxydase, tandis que la majorité serait le fait des p.p.ox., ou tout au moins des enzymes cupriques. Une telle conclusion est d'autant plus déroutante qu'on sait que le passage par les p.p.ox. n'est pas phosphorylant. Nous nous garderons donc d'une telle conclusion et nous admettons que, s'il est bien établi que CO inhibe l'absorption d'oxygène et l'oxydation de l'acétate, on ne peut acquérir aucune certitude, par cette expérimentation, quant au rôle des p.p.ox., ou plus généralement, des enzymes cupriques dans le processus respiratoire.

3 - Le diéthyl-dithiocarbamate de sodium (DIECA)

Le DIECA est un bon agent complexant du cuivre. Il a été maintes fois utilisé à ce titre, afin de distinguer les enzymes cupriques des cytochromes oxydases (97). Sa spécificité est, cependant, loin d'être absolue et il est admis qu'il réagit au moins partiellement avec le fer des cytochromes (3) (4). Par ailleurs, STENLID (167) attira l'attention sur la prudence dont on devait faire preuve dans l'interprétation des expériences utilisant le DIECA; c'est ainsi que l'oxydation du DIECA en bis-diéthyl-dithiocarbamate-disulfure fut mise en évidence par KEILIN & HARTREE (101) qui montrèrent l'action inhibitrice de ce composé sur la succino-deshydrogénase (SDH)

Nous avons employé le DIECA dans 6 expériences effectuées sur latex et sur dialysat afin d'éprouver son pouvoir inhibiteur dans nos conditions. Pour ce faire, nous avons utilisé comme critères d'inhibition sur dialysat: l'absorption d'oxygène, l'oxydation de l'acétate 2-C^{14} en C^{14}O_2 , la radioactivité des acides organiques et sur latex, le rendement de la biogenèse du caoutchouc à partir d'acétate marqué.

Le tableau 40 rapporte l'ensemble des résultats sur dialysat et sur le latex correspondant :

- Il apparaît que l'absorption d'oxygène est inhibée de façon très différente d'un latex à l'autre; à la concentration de 5.10^{-3} M, le pourcentage d'inhibition varie de 16 à 100 % selon les latex.
- Le rendement de l'oxydation de l'acétate est également très variable. Pour la même concentration que précédemment, le pourcentage d'inhibition se situe entre 0 et 97 %. Remarquons un certain parallélisme dans l'efficacité de l'inhibition si l'on considère l'absorption d'oxygène et l'oxydation de l'acétate.
- L'action du DIECA est particulièrement nette vis-à-vis de 2 acides organiques: la radioactivité incorporée dans l'acide citrique est considérablement accrue sous l'influence du DIECA, tandis que celle de l'acide succinique, soit passe par un maximum, soit augmente elle aussi régulièrement.

Le DIECA possède un effet dépressif variable sur la biogenèse du caoutchouc à partir de l'acétate. A 5.10^{-3} M, le pourcentage d'inhibition varie entre 17 et 81 %. Remarquons que les cas où l'inhibition est la plus nette correspondent au matériel végétal P-1, pour lequel l'absorption d'oxygène et l'oxydation de l'acétate étaient elles aussi considérablement inhibées.

Tableau 40: INHIBITION PAR LE DIECA SUR DIALYSAT ET SUR LATEX

Incubation :		SUR DIALYSAT						SUR LATEX	
Exp.	DIECA Concentr. M/L	O ₂ (*)		CO ₂ (**)		Ac. organ.		BS (***)	
		μ L.	Δ	Rdt	Δ	Citr. (cpm)	Succin. (cpm)	Rdt	Δ
1 m.v: P-1	0	220	-	19	-	35	130	29	-
	5.10^{-4}	0	-100	16	-19	65	235	25	-12
	1.10^{-3}	0	-100	2,5	-87	70	115	22	-24
	5.10^{-3}	0	-100	1,4	-93	100	20	20	-30
	1.10^{-2}	0	-100	1,2	-94	95	10	9,6	-67
2 m.v: B-3	0	790	-	38	-	-	-	0,4	-
	5.10^{-4}	790	-	41	-	-	-	0,2	-41
	1.10^{-3}	790	-	42	-	-	-	0,2	-41
	5.10^{-3}	410	- 48	47	-	-	-	0,3	-34
	1.10^{-2}	130	- 84	9,3	-75	-	-	0,2	-50
3 m.v: W-1	0	380	-	56	-	77	265	4,1	-
	5.10^{-4}	390	-	52	- 6,0	110	370	4,1	-
	1.10^{-3}	400	-	53	- 4,9	115	390	3,8	- 7,3
	5.10^{-3}	320	- 16	54	- 3,5	170	425	3,4	-17
	1.10^{-2}	240	- 37	34	-39	225	535	3,6	-12
(****) 4 m.v: B-1	0	620	-	57	-	5	0	32	-
	5.10^{-4}	380	- 39	55	- 3,5	25	5	8,6	-73
	1.10^{-3}	180	- 71	33	-42	295	20	5,7	-82
	5.10^{-3}	110	- 81	12	-79	440	65	5,9	-81
	1.10^{-2}	110	- 82	11	-81	360	110	4,2	-87
5 m.v: W-1	0	990	-	55	-	0	10	-	-
	5.10^{-4}	440	- 55	57	-	45	20	-	-
	1.10^{-3}	430	- 56	50	-	560	15	-	-
	5.10^{-3}	120	- 88	22	-61	1440	5	-	-
	1.10^{-2}	140	- 85	19	-65	1270	15	-	-
6 m.v: B-2	0	1060	-	59	-	20	35	19	-
	5.10^{-4}	910	- 14	59	-	25	55	16	-15
	1.10^{-3}	340	- 68	23	-61	360	135	15	-22
	5.10^{-3}	160	- 85	1,5	-97	270	115	8,2	-58
	1.10^{-2}	120	- 90	1,4	-98	190	110	-	-

Pour les expériences 1, 2 et 3, nous avons incubé 5 microcuries par ml de milieu et, pour les expériences 4, 5 et 6, 2,5 μ Ci par ml de milieu (3 heures à 30° C).

(*) Absorption d'oxygène en μ l/ml de dialysat et pour 3 heures d'incubation.

(**) Rendement de l'oxydation de l'acétate 2-C¹⁴ en C¹⁴O₂ (%).

(***) Rendement de la transformation de l'acétate 2-C¹⁴ en Cc radioactif (%).

(****) Matériel végétal utilisé pour l'expérience 4:

- Incubation sur dialysat: B-1

- Incubation sur latex : P-1

Nous avons vu dans la partie historique que la teneur en cuivre du latex était l'élément du latex susceptible de la plus grande variabilité. On peut se demander s'il ne faut pas voir dans cette variabilité de la teneur en cuivre, la raison de la plus ou moins grande efficacité du DIECA vis-à-vis des critères d'inhibition choisis. On a vu cependant apparaître un certain parallélisme dans l'efficacité de l'inhibition vis-à-vis des 3 critères considérés.

Nous avons constaté que l'accumulation du citrate marqué sous l'influence du DIECA est remarquable et, à notre connaissance, il n'a pas été fait état dans la littérature d'une inhibition de l'aconitase par le DIECA. Cependant, JAMES (98) a décelé une accumulation de citrate sous l'influence de l' $\alpha\alpha'$ dipyridyle, lequel est un inhibiteur relativement spécifique des enzymes ferriques; on peut donc éventuellement songer à attribuer cette action du DIECA à son manque de spécificité et à une action secondaire vis-à-vis du fer. Dans le même ordre d'idée, l'accumulation de la radioactivité dans le succinate, bien que moins intense et moins systématique, pourrait être due à l'oxydation du DIECA en un composé susceptible d'agir sur la SDH, comme nous l'avons vu plus haut (101).

L'emploi du DIECA conduirait à penser à l'importance des enzymes cupriques au sein du latex; nous ne sommes cependant toujours pas à même de préciser s'il s'agit réellement des p.p.ox.; qui plus est, on pourrait même en douter fortement, sachant que la thiourée et la phényl-thiourée qui sont très généralement recommandées en tant qu'inhibiteurs des p.p.ox. se sont avérées sans aucune action sur les 3 critères que nous avons utilisés ici (*).

4 - L'ortho-phénantroline et l' $\alpha\alpha'$ dipyridyle

L'o.phénantroline et l' $\alpha\alpha'$ -dipyridyle sont des complexants énergiques du fer. Selon DWYER & NYHOLM (62), le complexe Fer-o.phénantroline serait plus stable que le complexe avec l' $\alpha\alpha'$ dipyridyle; sa constante de dissociation est: $K = 10^{15}$ contre $K = 10^{13,1}$. Ces complexants sont donc susceptibles d'avoir une action sur la respiration et sur les enzymes ferriques en général.

Nous avons employé ces 2 complexants plus spécifiques des enzymes ferriques afin de comparer leur action à celle du DIECA plus spécifique des enzymes cupriques. Ils ont été utilisés sur dialysat et sur les latex correspondants en prenant comme critères de l'inhibition, l'absorption d'oxygène, le rendement de l'oxydation de l'acétate et, sur latex, le rendement de la biosynthèse du caoutchouc (Tableau 41).

Le tableau 41 fait apparaître une différence très nette d'activité entre l'o.phénantroline et l' $\alpha\alpha'$ dipyridyle:

- L'absorption d'oxygène est inhibée à 80 % environ des 5.10^{-4} M d'o.phénantroline, alors qu'il faut atteindre 5.10^{-3} M d' $\alpha\alpha'$ -dipyridyle pour obtenir une inhibition comprise entre 20 et 75 %.

(*) Etant donné les résultats négatifs de l'expérimentation entreprise sur ces 2 inhibiteurs, à la concentration de 1.10^{-3} à 1.10^{-2} M sur 3 latex différents, nous ne les avons pas décrites plus en détail.

Tableau 41: ACTION DE L'O.PHENANTROLINE ET L' $\alpha\alpha$ 'DIPYRIDYLE SUR DIALYSAT ET SUR LATEX.

Exp.		Concentration M/L	DIALYSAT				LATEX	
			O ₂ (*)		CO ₂ (**)		BS (***)	
			μ L	Δ	Rdt	Δ	Rdt	Δ
O. PHENANTROLINE	1 m.v. : P-1	0	300	-	57	-	21	-
		1.10 ⁻⁴	70	- 78	11	- 81	20	- 4
		5.10 ⁻⁴	70	- 78	3,7	- 94	17	- 20
		1.10 ⁻³	80	- 73	2,5	- 96	13	- 41
		5.10 ⁻³	70	- 78	1,6	- 97	9,8	- 54
	2 m.v. : B-1	0	-	-	2,8	-	17	-
		1.10 ⁻⁴	-	-	0,8	- 72	16	- 5
		5.10 ⁻⁴	-	-	0,8	- 72	18	-
		1.10 ⁻³	-	-	0,7	- 74	17	-
		5.10 ⁻³	-	-	0,6	- 78	9,0	- 47
	3 m.v. : W-1	0	270	-	42	-	3,8	-
		1.10 ⁻⁴	160	- 43	27	- 37	3,2	- 20
		5.10 ⁻⁴	50	- 82	2,1	- 95	3,0	- 21
		1.10 ⁻³	50	- 82	2,0	- 95	2,7	- 31
		5.10 ⁻³	40	- 87	1,9	- 96	0,9	- 76
$\alpha\alpha$ 'DIPYRIDYLE	1 m.v. : B-1	0	70	-	2,8	-	17	-
		1.10 ⁻⁴	-	-	3,0	-	15	- 11
		5.10 ⁻⁴	40	- 53	2,7	- 1	14	- 21
		1.10 ⁻³	50	- 21	2,6	- 8	17	-
		5.10 ⁻³	50	- 21	0,6	- 78	15	- 11
	2 m.v. : P-1	0	300	-	57	-	21	-
		1.10 ⁻⁴	280	- 7	50	- 13	21	-
		5.10 ⁻⁴	250	- 16	52	- 9	20	- 9
		1.10 ⁻³	270	- 9	58	-	17	- 20
		5.10 ⁻³	90	- 72	2	- 97	17	- 20
	3 m.v. : W-1	0	270	-	42	-	3,8	-
		1.10 ⁻⁴	310	-	45	-	3,5	- 9
		5.10 ⁻⁴	270	-	48	-	3,7	- 4
		1.10 ⁻³	350	-	45	-	3,8	-
		5.10 ⁻³	70	- 76	2,5	- 94	3,9	-

Incubation de 5 μ Ci d'acétate 2-C¹⁴ par ml de milieu, pendant 3 heures à 30° C.(*) Absorption d'oxygène en μ l par ml de dialysat pendant 3 heures d'incubation.(**) Rendement en % de l'oxydation de l'acétate 2-C¹⁴ en C¹⁴O₂(***) Rendement en % de la transformation de l'acétate 2-C¹⁴ en caoutchouc radioactif.

- Le rendement de l'oxydation de l'acétate est inhibé entre 72 et 95 % des $5.10^{-4}M$ du premier, alors qu'il faut une quantité 10 fois plus forte d' $\alpha\alpha'$ -dipyridyle pour la même inhibition.
- L'action de ces 2 inhibiteurs sur le rendement de la biosynthèse du caoutchouc à partir de l'acétate $2-C^{14}$ est beaucoup plus réduite comparativement aux 2 critères précédents. Il faut atteindre $5.10^{-3}M$ d'o.phénantroline pour obtenir une inhibition comprise entre 5 et 75 %, tandis que l' $\alpha\alpha'$ -dipyridyle est pratiquement inefficace.
- Nous avons noté par ailleurs une accumulation d'acide citrique pour une concentration de $1.10^{-4}M$ du premier inhibiteur.



On peut songer à attribuer à la plus grande stabilité du complexe fer-orthophénantroline, le pouvoir inhibiteur plus élevé de ce complexant.

Il peut paraître étonnant que l'absorption d'oxygène, que l'on a tout lieu d'attribuer à des enzymes cupriques, soit inhibée à 80 % par un complexant du fer.

L'inhibition de l'oxydation de l'acétate est, par contre, compatible avec ce qui est connu des relations entre la chaîne des cytochromes et cette oxydation.

L'action faible ou nulle des complexants du fer sur le rendement de la biogenèse du caoutchouc impliquerait que celle-ci soit relativement indépendante des processus liés à l'oxydation de l'acétate.

5 - Expérience récapitulative

Arrivé à ce point des expériences utilisant les inhibiteurs classiques de la respiration, il est d'ores et déjà évident que des contradictions, au moins apparentes, se font jour dans les conclusions que l'on peut tirer. Nous nous sommes alors demandés s'il ne fallait pas voir la cause de ces contradictions dans le fait que ces expériences n'ont pas été réalisées au même moment sur le même latex. Cette considération nous a amenés à réaliser une expérimentation dans laquelle il serait possible de comparer l'action des 4 inhibiteurs les plus efficaces sur un même latex, dans des conditions rigoureusement identiques. Nous avons utilisé CNH, CO, le DIECA et l'o.phénantroline en prenant comme critère l'absorption d'oxygène et le rendement de l'oxydation de l'acétate sur dialysats provenant de latex différents. Le tableau 42 montre les résultats de cette expérience.

Considérons tout d'abord les inhibiteurs individuellement :

Le CNH inhibe à 80-90 % l'absorption d'oxygène pour une concentration de $1.10^{-3}M$. A $1.10^{-3}M$, l'inhibition de l'oxydation de l'acétate est quasi totale dans 3 cas sur 4.

Le CO inhibe à 60-75 % l'absorption d'oxygène dans 3 cas sur 4, l'inhibition est plus réduite dans l'autre cas. Il n'apparaît pas de différence systématique entre l'inhibition à la lumière et à l'obscurité. L'oxydation de l'acétate est inhibée de 70 à 98 % à la lumière, tandis que l'inhibition à l'obscurité est systématiquement plus forte (98 à 99 %).

Le DIECA inhibe de 73 à 88 % l'absorption d'oxygène à $5.10^{-3}M$.

Il inhibe totalement l'oxydation de l'acétate à $5.10^{-3}M$.

Les taux d'inhibition de 50 % se situent entre 1.10^{-4} et $1.10^{-3}M$ et le plus souvent à moins de 5.10^{-4} .

L'o.phénantroline inhibe l'absorption d'oxygène de 65 à 80 % pour une concentration de $5.10^{-4}M$.

L'oxydation de l'acétate est inhibée entre 85 et 98 % pour une concentration aussi faible que $1.10^{-4}M$.

Si l'on considère maintenant l'action des différents inhibiteurs pour un latex donné, il apparaît tout d'abord que les 4 inhibiteurs utilisés sont dans l'ensemble également efficaces pour inhiber l'absorption d'oxygène et l'oxydation de l'acétate.

L'inhibition par le CNH intéressant tous les systèmes oxydasiques à groupe prosthétique métallique, on peut déduire de son action que la plus grande partie, sinon la totalité, des oxydases terminales nécessitent des métaux lourds.

L'inhibition pratiquement identique de l'absorption d'oxygène par le CO, selon que l'on travaille à la lumière ou à l'obscurité, indiquerait que la grande majorité de l'absorption d'oxygène dépend d'enzymes cupriques. De même, il faudrait admettre que la majorité des systèmes permettant l'oxydation de l'acétate nécessite des enzymes cupriques. Toutefois l'intensité plus marquée de cette inhibition à l'obscurité implique un certain rôle des enzymes ferriques.

La plus grande contradiction dans cette expérimentation (comme d'ailleurs dans les expériences précédentes) réside dans le fait que des inhibiteurs *en principe* spécifiques des enzymes ferriques ou des enzymes cupriques sont également susceptibles de bloquer à près de 100 % l'absorption d'oxygène et l'oxydation de l'acétate.

Nous remarquerons toutefois que l'o.phénantroline est plus efficace que le DIECA puisqu'elle conduit à la même inhibition que ce dernier, pour une concentration 10 fois plus faible.

En conclusion, il n'apparaît pas que l'on puisse impliquer la variabilité propre au latex dans les contradictions apparues précédemment, comme nous l'avions supposé en entreprenant cette expérience récapitulative.

6 - Le 2-4-dinitrophénol (2-4-DNP)

Le 2-4-DNP est un découpleur de la phosphorylation oxydative. Il n'inhibe pas en général aux concentrations utiles l'oxydation des divers substrats usuels, mais il découple cette oxydation de la synthèse des composés phosphorylés énergétiques qui lui est normalement liée. Le 2-4-DNP est donc susceptible de bloquer l'apport d'énergie résultant de la réoxydation des

cofacteurs pyridiniques ou flaviniques par la phosphorylation oxydative. Notons que, n'intervenant pas sur la phosphorylation liée au substrat (ATP résultant de la déphosphorylation du 1-3-diphosphoglycérate ou du 2 phospho-énolpyruvate), il n'inhibe donc pas totalement l'apport d'énergie.

Nous avons éprouvé son action vis-à-vis de la disponibilité en phosphore énergétique sur latex, vis-à-vis de la respiration sur dialysat et du rendement de la biosynthèse du caoutchouc sur latex.

Nous avons, tout d'abord, effectué des incubations de Pm* sur divers latex à 2 périodes différentes. Les résultats sont donnés dans les tableaux 43 et 44.

Tableau 43 : INHIBITION DE L'INCORPORATION DU Pm* DANS LE P.e.l. PAR LE 2-4-DNP.

2-4-DNP Concentration M/L	% de la radioactivité totale du sérum retrouvée dans le P.e.l.					
	Exp. A m.v. : B-2		Exp. B m.v. : P-2		Exp. C m.v. : B-2	
	%	Δ	%	Δ	%	Δ
0	9,9	-	10,6	-	9,3	-
5.10^{-4}	3,6	- 64	2,2	- 75	2,1	- 77
Incubation sur 5 ml de latex pendant 1 heure 30 à 30°C.						

Tableau 44 : INFLUENCE DU 2-4-DNP SUR LE TAUX DE P.e.l. ET LE RENDEMENT DE L'INCORPORATION DU Pm* DANS LE P.e.l.

2-4-DNP Concentr. M/L	Exp. 1 m.v. : P-1			Exp. 2 m.v. : W-7			Exp. 3 m.v. : B-1			Exp. 4 m.v. : B-2		
	P.e.l. (*)	Rdt (**)	Δ Rdt	P.e.l.	Rdt	Δ	P.e.l.	Rdt	Δ	P.e.l.	Rdt	Δ
0	0,92	5,8	-	0,66	7,6	-	0,84	6,9	-	0,87	8,0	-
5.10^{-5}	0,88	6,6	-	0,62	6,2	- 18	0,89	6,9	-	0,82	7,2	- 10
1.10^{-4}	0,91	4,8	- 17	0,68	5,1	- 33	0,87	6,7	- 3	0,84	5,9	- 26
5.10^{-4}	0,86	3,8	- 34	0,69	3,2	- 58	0,80	4,2	- 39	0,82	6,1	- 24
1.10^{-3}	0,89	3,2	- 45	0,64	3,1	- 59	0,76	3,4	- 51	0,82	6,1	- 24
5.10^{-3}	-	-	-	0,61	2,9	- 62	0,78	2,5	- 64	-	-	-
Incubation 1 heure à 30°C.												
(*) Taux de P.e.l. en mg												
(**) Rendement de l'incorporation du Pm* dans le P.e.l. (%)												

Il apparaît que le 2-4-DNP est en effet parfaitement susceptible de réduire, à des degrés divers, le rendement de l'incorporation du Pm* dans le P.e.l. c'est-à-dire en fait le renouvellement du P.e.l. et donc la disponibilité en énergie.

Nous remarquons d'autre part que cette inhibition est variable en fonction des latex et des saisons. Dans la 1^{ère} série d'expériences, le % d'inhibition varie entre 65 et 75 %, tandis que dans la 2^e série, il se situe entre 25 et 60 % pour une concentration de 5.10^{-4} M.

Il paraît intéressant de remarquer que le 2-4-DNP n'influe pratiquement pas sur le taux de P.e.l. à un moment donné mais uniquement sur son renouvellement. (Tableau 44)

Nous avons, dans une autre expérimentation, recherché une influence possible du 2-4-DNP sur la respiration des dialysats, en prenant comme critère l'absorption d'oxygène et le rendement de l'oxydation de l'acétate.

Tableau 45 : INFLUENCE DU 2-4-DNP SUR L'ABSORPTION D'OXYGÈNE ET L'OXYDATION DE L'ACÉTATE PAR DES DIALYSATS.

2-4-DNP Concentr. M/L	Exp. 1 m.v. : W-7			Exp. 2 m.v. : P-2			Exp. 3 m.v. : B-2			Exp. 4 m.v. : P-2		
	O ₂ (*)	CO ₂ (**)	Δ CO ₂	O ₂	CO ₂	Δ CO ₂	O ₂	CO ₂	Δ CO ₂	O ₂	CO ₂	Δ CO ₂
0	65	10	-	410	14	-	190	11	-	290	53	-
1.10 ⁻⁵	60	9,1	- 9	390	14	-	190	11	-	-	-	-
5.10 ⁻⁵	-	-	-	-	-	-	-	-	-	315	51	- 2,8
1.10 ⁻⁴	55	9,6	- 4	410	14	-	200	10	- 9	275	50	- 6,4
5.10 ⁻⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	-	270	50	- 5,2
1.10 ⁻³	55	10	-	-	9	- 36	170	11	-	210	51	- 33,2
5.10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	- 84
Incubation de 5 μCi d'acétate 2-C ¹⁴ par ml de dialysat (3 heures à 30° C.)												
(*) Absorption d'oxygène en μl par ml de dialysat pendant 3 heures d'incubation.												
(**) Rendement de l'oxydation de l'acétate 2-C ¹⁴ en C ¹⁴ O ₂ (en %).												

L'examen du tableau 45 entraîne les remarques suivantes :

- Il n'apparaît pas d'action remarquable du 2-4-DNP sur l'absorption d'oxygène, hormis peut-être pour les plus fortes doses.
- De même, l'action du 2-4-DNP sur l'oxydation de l'acétate est pratiquement nulle jusqu'à 1.10⁻³M et serait très marquée au delà de cette dose.

Dans une dernière série d'expériences, nous avons cherché à rattacher l'action du 2-4-DNP, précédemment mise en évidence vis-à-vis du renouvellement du P.e.l. sur latex, au rendement de la biosynthèse du caoutchouc à partir de l'acétate marqué également sur latex.

Nous avons effectué plusieurs séries d'incubation de 2-4-DNP sur divers latex et ceci à 2 périodes différentes (Tableau 46).

On constate une action systématique très nette, mais d'intensité variable, du 2-4-DNP sur le rendement de la biosynthèse du caoutchouc. L'action du 2-4-DNP, d'une part, sur le renouvellement du P.e.l. et, d'autre part, sur cette biosynthèse a pu être illustré clairement par ailleurs; il a en effet été possible de mettre en évidence l'existence de corrélations directes HS entre le renouvellement du P.e.l. et la biosynthèse du caoutchouc à partir d'acétate 2-C¹⁴ "in vitro", d'une part, et, d'autre part, entre ce même renouvellement et la production de l'arbre dont est issu le latex considéré (23). Tous ces résultats montrent que l'existence de la phosphorylation oxydative au sein du latex "in vitro" ne saurait être mise en doute.

Tableau 46 : INFLUENCE DU 2-4-DNP SUR LE RENDEMENT DE LA BIOSYNTHESE DU CAOUTCHOUC

2-4-DNP Concentration M/L	Rdt de la biosynthèse du Cc. marqué (%)					
	Exp. A m.v. : P-2	Exp. B m.v. : W-1	Exp. C m.v. : B-3	Exp. 1 m.v. : B-2	Exp. 2 m.v. : T-1	Exp. 3 m.v. : P-1
0	12,3	22,9	14,6	12,7	18,4	22,4
1.10^{-5}	13,2	19,5	12,7	-	-	-
5.10^{-5}	-	-	-	13,1	17,4	21,6
1.10^{-4}	8,1	8,6	9,0	13,4	14,2	21,6
5.10^{-4}	-	-	-	5,2	8,8	11,4
1.10^{-3}	0,0	0,2	0,6	0,1	4,7	6,6
Incubation de 5 μ Ci d'acétate $2-C^{14}$ par ml de latex (3 heures à 30°C.)						



Malgré de nombreux travaux, le mode d'action du 2-4-DNP n'est pas parfaitement connu; on a hésité longtemps entre une inhibition de la transformation de l'ADP en ATP et une hydrolyse de ce dernier dès sa formation. La tendance actuelle, comme l'expérimentation présentée ici, sont davantage en faveur de la 1^{ère} hypothèse que de la seconde, puisque nous avons montré dans le tableau 44 que le 2-4-DNP n'a pas d'action sur le P.e.l. préexistant. Quoiqu'il en soit, nous avons pu déceler une action très nette du 2-4-DNP sur le renouvellement du P.e.l., ce qui ne saurait surprendre, et nous avons pu relier cette inhibition à la biogenèse du caoutchouc, ce qui n'est pas non plus étonnant. Rappelons, comme nous l'avons dit précédemment, que le 2-4-DNP n'intervenant que sur la phosphorylation oxydative et non sur la phosphorylation liée au substrat, il est normal de constater, au moins dans certains cas, une biogenèse résiduelle du caoutchouc, même pour des doses relativement fortes d'inhibiteur.

Nous pouvons songer à attribuer l'absence d'action du 2-4-DNP sur l'absorption d'oxygène du latex au fait que celle-ci est dans sa grande majorité liée au fonctionnement des p.p.ox. L'inefficacité du 2-4-DNP vis-à-vis de l'oxydation de l'acétate pourrait être attribuée à la présence, au sein du dialysat, d'une quantité résiduelle de cofacteurs suffisante pour assurer cette oxydation.

7 - Discussion

Le cyanure, l'oxyde de carbone, le DIECA, l'o.phénantroline et, à un degré moindre, l' $\alpha\alpha'$ -dipyridyle sont susceptibles d'inhiber fortement l'absorption d'oxygène et l'oxydation de l'acétate $2-C^{14}$ en $C^{14}O_2$ pour les dialysats. Il faut admettre toutefois que ces inhibiteurs ne nous ont pas permis de mettre en évidence le ou les systèmes oxydasiques terminaux effectifs au sein des dialysats. On a constaté des contradictions, au moins apparentes, que nous ne savons expliquer dans l'état actuel de nos connaissances.

En effet, l'inhibition par l'oxyde de carbone à la lumière et à l'obscurité nous incite à penser que la majorité de l'absorption d'oxygène et de l'oxydation de l'acétate est liée au fonctionnement des oxydases cupriques. Ceci est confirmé par l'utilisation du DIECA. La contradiction se fait jour lorsqu'il apparaît que l'o.phénantroline, inhibiteur en principe spécifique des enzymes ferriques, est parfaitement efficace pour inhiber de façon quasi totale l'absorption d'oxygène et l'oxydation d'acétate. Si l'on avait de bonnes raisons de croire, tant par suite de nos résultats que des résultats antérieurs, que les p.p.ox. étaient responsables de la plus grande partie de l'absorption d'oxygène, il est par contre plus difficile d'admettre, au vu de l'inhibition par le CO et le DIECA, que l'oxydation de l'acétate $2-C^{14}$ en $C^{14}O_2$ est également dépendante des oxydases cupriques. L'action inhibitrice de l'o.phénantroline sur cette oxydation est d'ailleurs en contradiction.

La littérature fait souvent état de la quasi impossibilité d'utiliser des inhibiteurs réellement spécifiques des enzymes cupriques ou ferriques. Notre expérimentation ne nous permet pas de conclure si c'est le manque de spécificité des inhibiteurs employés ou l'existence, au sein du latex, d'un système oxydasique inconnu, qui est responsable des contradictions, au moins apparentes, que nous avons relevées.

Le problème du système oxydasique terminal effectif au sein du latex d'hévéa reste donc entier. Il ne nous a pas été possible dans le cadre limité de notre travail d'approfondir davantage cette question.

L'utilisation du 2-4-DNP ne nous a pas, par contre, amené d'ambiguïté. L'inhibition de la phosphorylation oxydative entraîne effectivement une réduction de l'énergie disponible sans limiter l'oxydation de l'acétate en CO_2 . Il est apparu également que la biosynthèse du caoutchouc était fortement réduite en même temps que la disponibilité en énergie par le 2-4-DNP. Remarquons enfin que l'action des autres inhibiteurs vis-à-vis de la biosynthèse du caoutchouc est beaucoup plus sujette à caution par suite de leur polyvalence.

D - ETUDE DES VOIES EMPRUNTEES PAR LE METABOLISME RESPIRATOIRE

Les expériences précédentes nous ont permis de déceler, au sein du latex et surtout au sein des dialysats, l'existence d'un métabolisme lié à la dégradation du glucose et à l'oxydation de l'acétate en CO_2 . Les voies assurant le transport des électrons du substrat à l'oxygène n'ont pas, par contre, pu être clairement définies. Nous chercherons maintenant à déterminer plus précisément les réactions métaboliques assurant l'oxydation en CO_2 du pyruvate et de l'acétate. On sait que plusieurs mécanismes, dont le cycle de Krebs est le plus connu, sont susceptibles d'effectuer une telle opération.

1 - Etude d'ensemble

Si le cycle de Krebs est le plus général des mécanismes oxydatifs de l'acétate, le shunt glyoxylique, comme le cycle des diacides et même l'oxydation acyclique de l'acétate, ont cependant été évoqués dans la littérature et leur fonctionnement a été démontré, ou tout au moins suggéré, dans

des cas plus particuliers. La plus grande partie de notre expérimentation a été réalisée sur dialysat, puisque nous avons pu y déceler une oxydation de l'acétate très supérieure à celle rencontrée sur latex.

Les critères le plus souvent utilisés ont été l'oxydation de l'acétate 2-C^{14} en C^{14}O_2 et la radioactivité des acides organiques qui en sont issus; les inhibiteurs classiques du cycle de Krebs, tels le malonate et le fluoracétate ont été employés en même temps que la technique de compétition isotopique

a) Compétition isotopique

La technique de "compétition isotopique" découle des travaux de ROBERTS & coll. (150) et de COWIE & coll. (57)

α) Compétition par tous les acides du cycle de Krebs

Dans une première série d'expériences, nous avons incubé 5 microcuries d'acétate 2-C^{14} par ml sur des dialysats de sérum + culot. Tous les acides du cycle de Krebs ont été ajoutés un à un à la concentration de 1.10^{-2}M . L'accumulation de la radioactivité dans les acides organiques et le rendement de l'oxydation de l'acétate marqué en C^{14}O_2 ont été employés comme critères.

- Accumulation des acides organiques marqués par compétition isotopique.

Remarquons tout d'abord que les méthodes chromatographiques employées ne permettraient pas de différencier le citrate de l'iso-citrate, que, par ailleurs, les acides cétoniques (oxalacétique et pyruvique), trop labiles, n'apparaissent pas sur les chromatogrammes, et qu'enfin, comme il n'a jamais été possible à ce jour de déceler dans ces conditions une radioactivité dans le cis-aconitate, il n'en est pas fait état dans les tableaux de résultats, bien qu'elle ait été déterminée.

Nous donnons dans le tableau 47 les mesures de la radioactivité décelée dans les divers acides organiques, après chromatographie bidimensionnelle.

- Il apparaît que l'apport de citrate, de cis-aconitate et d'iso-citrate a un effet relativement faible ou nul sur l'accumulation de la radioactivité dans ces mêmes composés. Remarquons que ces mêmes composés ont souvent un effet positif assez net sur la radioactivité du succinate et, à un degré moindre, du ceto-glutarate et du malate.
- L'alpha-cétoglutarate est susceptible de s'accumuler assez nettement par compétition isotopique; il entraîne également une augmentation de la radioactivité dans le succinate.
- L'apport de succinate amène une augmentation remarquable de la radioactivité du même succinate, ainsi que du fumarate.
- Le fumarate entraîne, de façon extrêmement nette, une augmentation de la radioactivité au niveau du fumarate et du succinate.
- L'accumulation de la radioactivité dans le malate, par apport de malate non radioactif, est faible ou nulle.
- Les apports d'oxalacétate et de pyruvate n'ont pas d'effet systématiquement net sur la radioactivité des autres acides organiques.

Tableau 47 : RADIOACTIVITE DES ACIDES ORGANIQUES RESULTANT DE L'INCURATION D'ACETATE 2-C¹⁴
APRES COMPETITION ISOTOPIQUE.

Résultats en cpm après comptage sur les chromatogrammes.

MOTIFS	Citr.-Iso-citr.			α -Cétyoglutarate			Succinate			Fumarate			Malate		
	Exp. 1	Exp. 2	Δ	Exp. 1	Exp. 2	Δ	Exp. 1	Exp. 2	Δ	Exp. 1	Exp. 2	Δ	Exp. 1	Exp. 2	Δ
	cpm	cpm		cpm	cpm		cpm	cpm		cpm	cpm		cpm	cpm	
Témoin	175	-		80	-		140	-		10	-		15	-	
+ Citrate	180	+ 3	- 37	145	+ 100	+ 81	205	+ 46		10	-		20	+ 300	+ 100
+ Aconitate	200	+ 15	- 25	110	+ 45	+ 37	225	+ 60		10	-		5	-	+ 200
+ Isocitrate	180	+ 3	+ 19	160	+ 9	+ 100	150	+ 7		10	-		5	-	+ 100
+ α -Céto-glutarate	215	+ 23	- 6	250	+ 118	+ 212	205	+ 46		-	-		25	+ 400	+ 566
+ Succinate	70	- 60	-	950	+ 36	+ 1087	995	+ 611		-	-		250	+ 4900	+ 1033
+ Fumarate	220	+ 26	- 19	1325	- 10	+ 1556	870	+ 521		70	+ 600		270	+ 5300	+ 366
+ Malate	200	+ 15	- 62	775	- 73	+ 869	60	- 57		-	-		5	-	- 33
+ Oxalacét.	80	- 54	+ 37	75	-	- 6	85	- 39		-	-		5	-	- 33
+ Pyruvate	60	- 65	- 37	570	- 82	+ 612	30	- 78		-	-		5	-	- 33

Incubation de 5 μ Ci d'acétate-2-C¹⁴ par ml de dialysat + 10 μ mol. de chacun des acides organiques du cycle de Krebs (3 heures à 30° C).

Matériel végétal utilisé: - Exp. 1: P-2; - Exp. 2: B-3.

Dans cette expérience, on remarquera que la compétition isotopique la plus marquée se produit au niveau succinate-fumarate, ce qui laisserait pré-sager un rôle privilégié de ces composés dans les mécanismes d'oxydation.

- Action de l'apport des acides organiques sur le rendement de l'oxydation de l'acétate 2-C^{14} en C^{14}O_2 .

Les résultats sont donnés dans le tableau 48. Il n'a pas été tenu compte des différences de rendement entraînant des variations de Δ inférieures à 15 %.

Tableau 48

MOTIF	SERUM + CULOT			
	Exp. 1 m.v. : P-2		Exp. 2 m.v. : B-3	
	Rdt %	Δ	Rdt %	Δ
Témoin	24	-	43	-
+ Citrate	23	-	43	-
+ Cis-aconitate	22	-	48	-
+ Iso-citrate	20	- 15	46	-
+ α -Cétoglutarate	22	-	39	-
+ Succinate	20	- 15	33	- 25
+ Fumarate	19	- 20	35	- 20
+ Malate	20	- 15	32	- 25
+ Oxalacétate	21	-	27	- 35
+ Pyruvate	14	- 40	3	- 95

Incubation de 5 μCi d'acétate 2-C^{14} par ml de sérum + culot, + 10 μmol . de chacun des acides organiques du cycle de Krebs (3 heures à 30°C .).

- Le citrate, le cis-aconitate et l'iso-citrate n'ont, en l'occurrence, pratiquement aucune action sur le rendement de l'oxydation de l'acétate.
- Le succinate, le malate et le fumarate possèdent, de façon systématique, une action dépressive marquée sur l'oxydation de l'acétate.
- L'action du pyruvate est, de loin, la plus intense; on peut, cependant, songer à l'attribuer à une décarboxylation partielle de ce pyruvate en acétate, lequel est susceptible d'amener une dilution de la très faible quantité d'acétate marqué incubée (0,5 micromol.).
- L'oxalacétate possède une action dépressive supérieure à celle du citrate, du malate et du succinate, mais cependant inférieure à celle du pyruvate. On peut, là encore, se demander si cette action est réellement consécutive à une compétition isotopique ou s'il ne faut pas voir ici une conséquence de l'action inhibitrice bien connue de l'oxalacétate sur la SDH ou encore d'une inhibition de l'aconitase par l'oxalomalate (156).

Si l'on excepte l'action du pyruvate et de l'oxalacétate, il ressort que le succinate, le fumarate et le malate, à la dose utilisée dans cette expérimentation, possèdent l'action dépressive la plus nette et la plus significative sur l'oxydation de l'acétate 2-C^{14} en C^{14}O_2 .

Cette première expérimentation aura montré que les acides citrique, alpha-cétoglutarique, succinique, fumarique et malique sont susceptibles, de façon plus ou moins systématique et à des degrés divers, de s'accumuler par compétition isotopique.

On a pu constater également que, à la dose utilisée, certains acides du cycle de Krebs possèdent une nette action dépressive sur le rendement de l'oxydation de l'acétate. Ces premiers résultats tendent à montrer qu'au moins certains des acides organiques du cycle de Krebs sont impliqués lors de l'oxydation de l'acétate, dans nos conditions opératoires.

β) Compétition par 3 acides particuliers en concentration variable

Dans une 2^{ème} série d'expériences, nous nous sommes attachés plus particulièrement à l'étude de l'effet dépressif sur le rendement de l'oxydation, en utilisant des concentrations croissantes de 3 acides particuliers : le citrate, le succinate et le malate. Ces 3 acides ont été choisis parce qu'ils se situent tous trois à l'entrée d'un cycle oxydatif de l'acétate et qu'ils proviennent du métabolisme de celui-ci par une seule réaction. C'est ainsi que le citrate résulte de la fixation de l'acétate sur l'oxalacétate (cycle de Krebs), que le succinate peut provenir de l'oxydation de 2 acétates par la condensation de Thunberg (cycle des diacides), tandis que le malate peut résulter de la fixation de l'acétate sur le glyoxylate sous l'action de la malate synthétase (cycle glyoxylique).

Les résultats de cette expérimentation, répétée 3 fois sur des dialysats provenant de 3 sérums-culots différents, sont donnés dans la figure 21.

Il ressort clairement de cette expérimentation que le malate et surtout le succinate ont un effet dépressif remarquable sur l'oxydation de l'acétate marqué et ce, dès les plus faibles doses. Au contraire, l'action du citrate est nulle ou très réduite aux faibles concentrations, et peut être très marquée pour les concentrations les plus fortes. Cette expérimentation, comme la précédente, attire l'attention sur le rôle particulier du succinate (et du malate) par rapport au citrate.

Le tableau 49 montre l'influence de l'apport d'un taux croissant de citrate, succinate et malate, sur la radioactivité incorporée à partir de l'acétate dans ces mêmes acides.

Il apparaît que l'accumulation de la radioactivité dans le citrate est faible ou nulle, 2 fois sur 3; dans la 3^{ème} expérience, l'accumulation la plus nette de la radioactivité se produit pour les doses de citrate ayant le moins d'effet sur l'oxydation de l'acétate. Par contre, dans ces 3 expériences, de même que dans l'expérimentation précédente, l'accumulation de la radioactivité dans le succinate est remarquable. En l'occurrence, l'accumulation du malate marqué est très nette, mais beaucoup moins intense que celle du succinate.

Il est intéressant de remarquer que l'apport de citrate ou de malate en taux croissants induit une accumulation parfois spectaculaire de la radioactivité dans le succinate. On peut penser que ceci résulte du fait qu'une faible partie de ces substrats est métabolisée en succinate, venant ainsi créer une compétition isotopique à ce niveau.

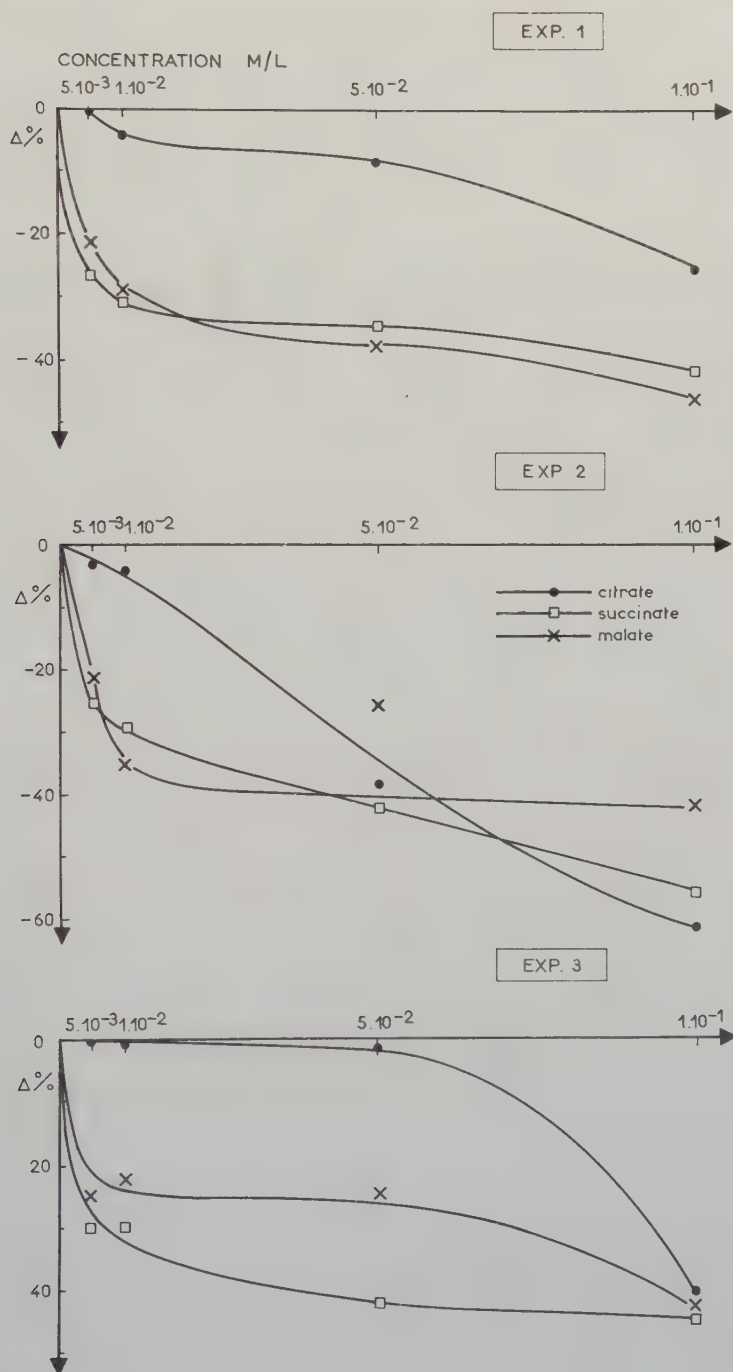


Figure : 22 INFLUENCE DE L'APPORT D'UN TAUX CROISSANT DE CITRATE, MALATE ET SUCCINATE SUR LE RENDEMENT DE L'OXYDATION DE L'ACETATE 2-C¹⁴ en C¹⁴O₂

Tableau 49 : INFLUENCE DE L'APPORT DE CITRATE,
SUCCINATE ET MALATE SUR LA RADIOACTIVITE
DE QUELQUES ACIDES ORGANIQUES.

MOTIF Exp.	Radioactivité des ac. organiques en cpm								
	Citrate Isocitrate			Succinate			Malate		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
TEMOIN	140	75	10	40	140	20	15	30	0
CITRATE									
5.10 ⁻³ M	135	90	275	105	275	30	15	50	20
1.10 ⁻²	115	100	180	215	325	35	15	65	10
5.10 ⁻²	70	40	100	410	330	140	50	45	35
1.10 ⁻¹	35	15	45	570	305	290	70	20	50
SUCCINATE									
5.10 ⁻³ M	150	85	90	1000	800	1315	-	60	75
1.10 ⁻²	150	75	60	1180	875	1565	-	70	60
5.10 ⁻²	170	30	100	1115	575	1225	-	35	80
1.10 ⁻¹	90	35	75	705	325	1045	-	45	130
MALATE									
5.10 ⁻³	120	85	75	260	585	500	30	65	55
1.10 ⁻²	100	90	115	335	575	685	30	75	80
5.10 ⁻²	65	70	110	920	815	1740	95	370	545
1.10 ⁻¹	110	40	145	895	630	2160	245	370	445
Incubation 5 μ Ci d'acétate 2-C ¹⁴ par ml de dialysat (3 heures à 30°C.) Matériel végétal : Exp. 1 : B-3, Exp. 2 : P-1, Exp. 3 : B-2.									

y) Discussion

Nous avons donc vu qu'il était possible d'accumuler, par compétition isotopique, une certaine radioactivité dans les principaux acides du cycle de Krebs. Cette accumulation est toutefois variable selon les acides introduits et la provenance des dialysats; c'est ainsi qu'il n'a pas été possible de mettre en évidence une augmentation de la radioactivité dans le citrate et le malate, par compétition isotopique, alors que nous avons pu le faire dans des expériences réalisées dans un autre but (p. 77). On notera que le succinate et le fumarate marqués sont susceptibles de s'accumuler de façon remarquable.

Si l'on considère l'influence de la compétition isotopique sur le rendement de l'oxydation de l'acétate 2-C¹⁴ introduit, on constate l'action nette et systématique du malate et surtout du succinate, dès les plus faibles concentrations.

Tout ceci conduit à penser que le succinate joue, par rapport au citrate, un rôle privilégié dans l'oxydation de l'acétate. Tout se passe comme si, dans nos conditions, le citrate n'était pas obligatoirement le premier produit résultant de l'acétate dans son métabolisme oxydatif.

b) Inhibition par le fluoracétate

Il est très généralement admis que le fluoracétate est susceptible de se transformer, dans un milieu biologique, en fluorocitrate, lequel est un inhibiteur de l'aconitase (135). Son action se traduit par une inhibition de la respiration et une accumulation de citrate lorsque le cycle de Krebs est la dernière étape de cette respiration.

Nous avons eu précédemment quelques doutes concernant le fonctionnement de l'aconitase en tant que première phase de l'oxydation de l'acétate; l'emploi du fluoracétate se justifiait donc pour tenter de lever ces doutes.

Le fluoracétate a été utilisé, à pH 7 et à pH 4 sur latex et sur dialysat.

α) Le fluoracétate à pH 7

Le pouvoir inhibiteur du fluoracétate a, tout d'abord, été éprouvé à pH 7 sur dialysat en prenant comme critères l'absorption d'oxygène, le rendement de l'oxydation de l'acétate et l'accumulation de la radioactivité dans le citrate.

Le tableau 50 fait état des résultats moyens de 6 expériences effectuées sur 6 dialysats différents.

Tableau 50 : ACTION DU FLUORACETATE SUR L'ABSORPTION D'OXYGENE, L'OXYDATION DE L'ACETATE ET LA RADIOACTIVITE DU CITRATE SUR DIALYSAT.

FLUORACETATE Concentration M/L	O ₂ (*)		CO ₂ (**)		Ac. citrique	
	microl.	Δ	Rdt	Δ	cpm	Δ
0	687	-	53	-	9	-
1.10 ⁻³	609	- 11	50	- 5	83	+ 822
5.10 ⁻³	570	- 17	52	- 2	184	+ 1944
1.10 ⁻²	541	- 21	50	- 5	328	+ 3544
5.10 ⁻²	480	- 30	57	-	1084	+ 11944

Incubation de 5 μ Ci d'acétate 2-C¹⁴ par ml de dialysat (3 heures à 30° C.)
 (*) Absorption d'oxygène en μ l par ml de dialysat et pendant 3 heures d'incubation.
 (**) Rendement de l'oxydation de l'acétate 2-C¹⁴ en C¹⁴O₂ (%)

- Il apparaît que, vis-à-vis de l'absorption d'oxygène, l'action du fluoracétate est faible; il faut atteindre une concentration de 5.10⁻²M pour obtenir une inhibition de 30 %.
- L'oxydation de l'acétate n'est pas inhibée par le fluoracétate pour des concentrations comprises entre 1.10⁻³ et 5.10⁻²M
- On constate une accumulation remarquable de la radioactivité apportée par l'acétate dans le citrate. L'augmentation de la radioactivité du citrate suit en gros celle de la concentration; à 5.10⁻²M, on trouve dans le citrate une radioactivité représentant plus de 100 fois celle du motif témoin.

De cette expérimentation, on serait amené à conclure que l'oxydation de l'acétate ne passe pas, dans nos conditions, par l'aconitase et le cycle de Krebs bien que l'aconitase soit réellement présente et effectivement inhibée par le fluoracétate, comme le montre l'accumulation du citrate.

Nous avons, par ailleurs, déterminé l'action d'un taux croissant de fluoracétate sur latex (à pH 7), en utilisant cette fois ci comme critère, le rendement de l'incorporation de l'acétate dans le caoutchouc et la radioactivité du citrate.

Tableau 51 : ACTION DU FLUORACETATE SUR LE RENDEMENT DE LA BIOSYNTHESE ET LA RADIOACTIVITE DU CITRATE SUR LATEX.

FLUORACETATE Concentration M/L	Exp. 1 m.v. : P-1		Exp. 2 m.v. : B-1		Exp. 3 m.v. : B-3		Exp. 4 m.v. : B-1	
	Rdt (*)	cpm (**)	Rdt	cpm	Rdt	cpm	Rdt	cpm
0	33	425	15	75	2,5	65	18	90
1.10^{-3}	34	445	17	85	3,5	95	23	-
5.10^{-3}	40	370	21	35	2,4	60	18	86
1.10^{-2}	30	225	-	25	3,0	70	18	115
5.10^{-2}	-	-	18	35	1,2	10	4,2	35

Incubation de $5 \mu\text{Ci}$ d'acétate 2-C^{14} par ml de latex (3 heures à 30°C)
 (*) Rendement de la transformation d'acétate 2-C^{14} en Cc.* (%)
 (**) Radioactivité de l'acide citrique en cpm.

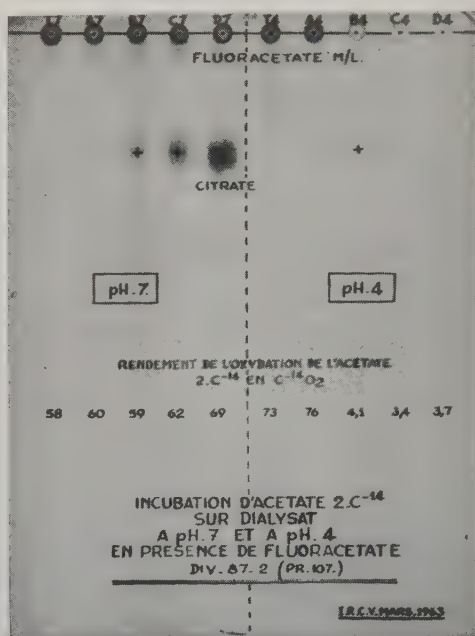
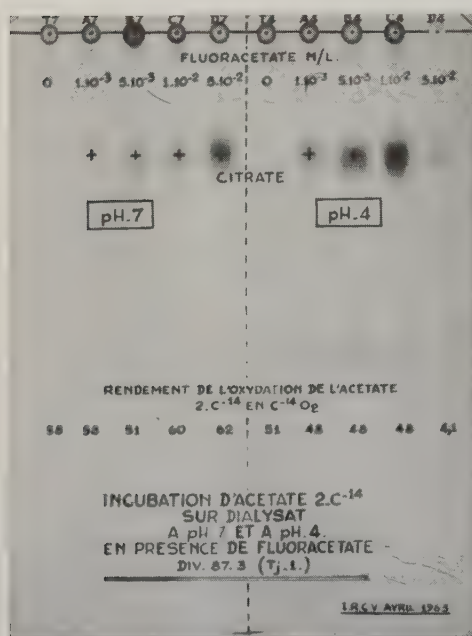
Le tableau 51 donne les résultats de 4 expériences réalisées sur 4 latex différents. Il apparaît que l'action du fluoracétate sur la biogenèse du caoutchouc et du citrate est pratiquement nulle dans nos conditions. On ne peut, en effet, accorder d'attention à une action légèrement dépressive pour une concentration aussi élevée que 5.10^{-2}M .

On serait amené à conclure de cette 2^{ème} expérimentation que le fonctionnement de l'aconitase est nul sur latex et que, consécutivement, la biogenèse du caoutchouc n'est pas dépendante du fonctionnement du cycle de Krebs.

β) Le fluoracétate à pH 4

L'influence du pH du milieu sur le pouvoir inhibiteur du fluoracétate est beaucoup moins souvent évoqué que dans le cas du malonate. Pour celui-ci, il a été clairement montré que, seule, la forme non dissociée était active, ce qui impliquait de travailler à des pH acides. A la différence de l'inhibition malonique, les divers auteurs ne semblent attribuer que peu d'importance au pH du milieu (97) (76). Cependant, BLACK et HUTCHENS (42) notent une augmentation de l'inhibition lorsque le pH est abaissé de 6,0 à 4,0. Par ailleurs, ALDOUS & ROZEE (5) étudient systématiquement cette inhibition pour les pH acides; ils attribuent l'augmentation considérable de l'inhibition de l'absorption d'oxygène constatée, pour les pH très acides (pH 1 à 2), sur des cultures de levure, au fait que l'acide fluoracétique est totalement dissocié au delà de pH 5 et ils montrent que la courbe d'absorption d'oxygène suit très exactement la concentration en acide non dissocié. On notera qu'à pH 4, 5 % de l'acide fluoracétique seulement est non dissocié. Ces résultats nous ont conduits à reprendre l'étude de l'inhibition par le fluoracétate, mais en travaillant cette fois à un pH acide. Nous avons choisi arbitrairement le pH 4 pour lequel nous avons vu précédemment que l'oxydation de l'acétate n'était pas réduite mais, au contraire, légèrement augmentée.

Les mêmes critères que pour l'expérimentation à pH 7 ont été considérés. Les résultats de 8 expériences figurent dans le tableau 52. Dans certains cas, nous avons effectué un témoin à pH 7 et la comparaison de l'inhibition à pH 7 et à pH 4 sur le dialysat provenant du même latex. Cette comparaison est illustrée dans les figures 23 et 24.



Figures 23 et 24 : COMPARAISON DE L'ACTION DU FLUORACÉTATE A pH 4 ET A pH 7 SUR LA RADIOACTIVITÉ DU CITRATE ET LE RENDMENT DE L'OXYDATION DE L'ACÉTATE 2-C¹⁴ EN C¹⁴O₂.

Sur ces 2 figures apparaît l'accumulation d'acide citrique marqué en fonction de la concentration du fluoracétate à pH 4 et à pH 7. On a également noté le rendement de l'oxydation de l'acétate en CO₂. Il apparaît qu'à pH 7, la radioactivité du citrate suit la concentration en inhibiteur, tandis qu'à pH 4, la radioactivité du citrate décroît dès la première dose de fluoracétate efficace (figure 23) ou est pratiquement nulle quelle que soit la dose (figure 24).

L'examen des résultats moyens du tableau 52 fait apparaître que :

- L'absorption d'oxygène sur un dialysat à pH 4 est plus réduite que pour le même dialysat à pH 7. Ce résultat avait déjà été mis en évidence (p. 77) et est à rapprocher des travaux de HSIA sur les poly-phénol-oxydases (80).
- L'absorption d'oxygène est fortement inhibée par le fluoracétate à pH 4.
- L'oxydation de l'acétate en CO₂ est inhibée à 50 %, dès une concentration de 5.10^{-3} M. On atteint une inhibition de 92 % à 5.10^{-2} M.
- L'accumulation d'acide citrique marqué passe par un maximum pour 1.10^{-2} M et décroît considérablement ensuite.

Tous ces résultats semblent à priori s'accorder pour faire admettre l'efficacité du fluoracétate à pH 4 pour inhiber l'oxydation de l'acétate. Cependant, un examen plus attentif des résultats peut laisser planer quelques doutes :

- On ne peut guère arguer de l'inhibition de l'absorption d'oxygène en faveur de l'action du fluoracétate sur l'oxydation de l'acétate. En effet, toutes les expériences précédemment décrites ont attiré l'attention sur le découplage quasi systématique de ces 2 critères.
- Il faut parfois atteindre $1.10^{-2}M$ (Exp. 4) et même $5.10^{-2}M$ (Exp. 1 et 6) pour obtenir l'inhibition qui est de toute façon très brutale et non progressive.
- On remarquera qu'il existe un décalage notable entre l'inhibition de l'oxydation de l'acétate et la radioactivité accumulée dans le citrate. C'est ainsi que l'inhibition maximale ne correspond jamais à l'accumulation maximale du citrate. Au contraire, cette dernière se situe parfois *avant* l'apparition de toute inhibition (Exp. 6 et 7) et le plus souvent pour la 1^{ère} dose de fluoracétate entraînant une inhibition, même très partielle. Ce dernier point a particulièrement retenu l'attention. On peut en effet se demander si, en milieu acide et aux concentrations relativement fortes utilisées, le fluoracétate ne perd pas sa spécificité vis-à-vis de l'aconitase.

Afin de tenter d'éclaircir cette question, nous avons effectué des inhibitions comparées, par le fluoracétate à pH 7 et à pH 4, en utilisant comme substrat non plus l'acétate $2-C^{14}$, mais le succinate et le fumarate $2-3-C^{14}$ (Tableaux 53 et 54).

Tableau 53 : INHIBITION DE L'OXYDATION DU SUCCINATE $2-3-C^{14}$
PAR LE FLUORACETATE SUR DIALYSAT A pH 7 et pH 4.

FLUORACETATE Concentration M/L		Absorp. d'O ₂ microl./ml 3 heures	Rdt % oxydation en C ¹⁴ O ₂	Radioact. en cpm des acides	
				citrique	succin.
pH 7 m.v. : P-1	0	1320	49	19	32
	1.10 ⁻³	1170	48	27	74
	5.10 ⁻³	1080	49	41	57
	1.10 ⁻²	1020	47	78	145
	5.10 ⁻²	950	45	153	57
pH 4 m.v. : P-1	0	650	66	19	97
	1.10 ⁻³	460	51	87	103
	5.10 ⁻³	90	3,6	204	5870
	1.10 ⁻²	70	2,8	174	7130
	5.10 ⁻²	60	2,5	40	9130

Incubation de 2,5 μCi de succinate 2-3-C¹⁴ par ml de dialysat (3 heures à 30° C).

Le tableau 53 donne les résultats de l'incubation de succinate $2-3-C^{14}$, les mêmes critères que précédemment ont été étudiés. La figure 23 montre l'accumulation des acides organiques dans cette expérience.

- L'absorption d'oxygène est d'une part plus faible à pH 4 et d'autre part considérablement plus inhibée par le fluoracétate en milieu acide.

- L'oxydation du succinate n'est pas inhibée à pH 7 et fortement inhibée à pH 4 dès 5.10^{-3} M de fluoracétate.
- La radioactivité accumulée dans le citrate croît régulièrement en fonction du fluoracétate à pH 7. Elle passe par un maximum à pH 4 pour la 1^{ère} dose de fluoracétate faisant apparaître une inhibition marquée (5.10^{-3} M).
- L'accumulation du malate est nulle à pH 7, faible à pH 4 et passe par un maximum (figure 24).
- L'accumulation du succinate non transformé est faible et irrégulière à pH 7 mais considérable à pH 4 dès la première dose correspondant à l'inhibition (5.10^{-3} M).
- L'accumulation du fumarate (figure 24) est également maximum pour cette dose (5.10^{-3} M).
- Les constatations faites précédemment pour l'absorption d'oxygène sont toujours valables : absorption réduite et inhibition beaucoup plus marquée à pH 4.

Tableau 54 : INHIBITION DE L'OXYDATION DU FUMARATE 2-3- C^{14}
PAR LE FLUORACETATE SUR DIALYSAT A pH 7 ET A pH 4

FLUORACETATE Concentration M/L		Absorp. d'O ₂ microl./ml 3 heures	Rdt % oxydation en C ¹⁴ O ₂	Radioactivité en cpm			
				Citrique	Malate	Succin.	Fumar.
pH 7 m.v. : P-1	0	600	90	11	-	70	30
	1.10 ⁻³	610	88	55	-	70	45
	5.10 ⁻³	605	89	183	-	75	40
	1.10 ⁻²	615	80	339	-	105	50
	5.10 ⁻²	540	77	902	-	85	40
pH 4 m.v. : P-1	0	180	28	50	455	415	665
	1.10 ⁻³	85	2,3	225	1.760	245	4430
	5.10 ⁻³	0	0,2	55	670	140	14730
	1.10 ⁻²	0	0,5	35	455	125	14020
	5.10 ⁻²	0	0,1	30	265	135	16120
Incubation de 2,5 μCi de fumarate 2-3-C ¹⁴ par ml de dialysat (3 heures à 30°C)							

Le Tableau 54 illustre les résultats de l'expérience effectuée en utilisant le fumarate 2-3- C^{14} comme substrat.

- Il apparaît également une action très faible ou nulle du fluoracétate à pH 7 sur l'oxydation du fumarate, tandis qu'elle est très marquée à pH 4 dès 1.10^{-3} M.
- L'accumulation d'acide citrique est régulière et très marquée à pH 7, tandis qu'à pH 4 elle est plus faible et passe par un maximum pour la 1^{ère} dose, faisant apparaître une inhibition (1.10^{-3} M).
- L'accumulation d'acide malique est nulle à pH 7 et passe par un maximum à pH 4 pour cette même dose (1.10^{-3} M).
- La radioactivité du succinate varie peu à pH 7 et décroît régulièrement à pH 4 en fonction de la concentration en inhibiteur.
- Alors que tout le fumarate est métabolisé à pH 7, il apparaît qu'à pH 4, il s'accumule remarquablement dès 1.10^{-3} M.

Ces 2 expériences effectuées en utilisant le succinate et le fumarate entraînent les remarques suivantes :

- Nous ne tirerons pas de conclusion de l'inhibition de l'absorption d'oxygène à pH 4 pour les raisons données précédemment à propos de l'acétate.
- A la différence des incubations à pH 7, et quel que soit le substrat utilisé, l'accumulation de citrate marqué ne suit pas l'inhibition de l'oxydation du substrat. D'une part, elle est toujours beaucoup moins marquée qu'à pH 7 et d'autre part le maximum de radioactivité correspond à la 1^{ère} concentration efficace.
- L'accumulation de malate passe également par un maximum pour les premières concentrations efficaces.
- L'accumulation du promoteur marqué introduit (succinate ou fumarate) est très spectaculaire dès la première concentration efficace de fluoracétate.

γ) Discussion

Nous rappellerons tout d'abord brièvement les résultats des expériences que nous venons de décrire

- Le fluoracétate est inefficace sur latex à pH 7 pour bloquer l'aconitase et n'a pas d'influence sur le rendement de la biogenèse du caoutchouc. Des expériences ayant précédemment montré la faible I.R. sur latex, il s'ensuit

(Incubation de 2,5 microcuries de succinate 2-3- C^{14} par ml de dialysat, 3 heures à 30° C)

A pH 4 la radioactivité du citrate décroît dès la première concentration efficace de fluoracétate

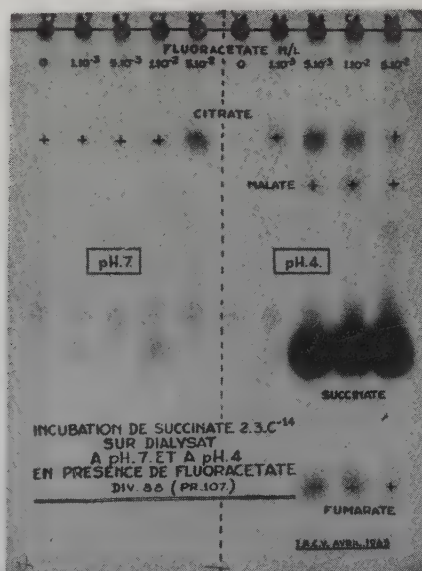


Figure 25: INFLUENCE DE L'INHIBITION PAR LE FLUORACETATE A pH 4 ET A pH 7 SUR LA RADIOACTIVITE DES ACIDES ORGANIQUES

qu'on peut admettre que l'oxydation des produits de la glycolyse ne serait pas liée, dans nos conditions, à la biogenèse du caoutchouc.

- Le fluoracétate à pH 7 est efficace pour inhiber très nettement l'aconitase sur dialysat (si on en juge par l'accumulation remarquable de citrate) sans qu'il s'ensuive une réduction de l'oxydation de l'acétate.
- A pH 4, le fluoracétate est susceptible d'inhiber fortement l'oxydation de l'acétate, du succinate et du fumarate; toutefois l'accumulation de citrate est considérablement plus réduite qu'à pH 7 et n'est plus proportionnelle à la concentration de fluoracétate. En utilisant le succinate et le fumarate, on constate que l'accumulation de la radioactivité sous l'influence du fluoracétate est remarquable au niveau de ces promoteurs et très réduite au niveau du citrate.

On peut imaginer à priori 3 hypothèses pour tenter d'expliquer le comportement du fluoracétate :

1°) Le fluoracétate est inefficace à pH 7; par contre, son action à pH 4 montre la réalité du fonctionnement du cycle de Krebs dans nos conditions.

2°) Le fluoracétate est efficace à pH 7 pour inhiber l'aconitase et donc, le fonctionnement du cycle de Krebs, lequel ne serait pas la voie d'oxydation de l'acétate dans nos conditions. L'action du fluoracétate à pH 4 serait due à un manque de spécificité de celui-ci en milieu acide.

3°) Le fluoracétate est efficace à pH 7 pour inhiber le fonctionnement du cycle de Krebs, mais dans ces conditions il apparaît un mécanisme shunt susceptible de remplacer le cycle de Krebs. A pH 4, le mécanisme shunt est également inhibé par suite d'un manque de spécificité du fluoracétate en milieu acide.

Nous critiquerons maintenant ces hypothèses en fonction de nos résultats expérimentaux.

- La première hypothèse considérant que le fluoracétate est inefficace à pH 7, ne tient pas compte du fait que l'accumulation remarquable de citrate marqué indique effectivement une inhibition très nette de l'aconitase à ce pH. On peut, par ailleurs, avoir quelques doutes, par suite de la faible accumulation de citrate à pH 4, lorsque le fluoracétate s'avère efficace. Le découplage entre l'accumulation de citrate et l'inhibition de l'oxydation des divers substrats est également à considérer. Enfin, le fait que la radioactivité introduite par le succinate et le fumarate n'atteigne que peu le citrate et reste, pour la plus grande partie, dans les promoteurs est non moins étonnante. On pourrait, en effet, s'attendre à une accumulation remarquable au niveau de l'inhibition et non avant. C'est ainsi que nous avons vu que le blocage de l'énolase par le FNa entraînait une accumulation très marquée de 3-PGA, et qu'il est connu que le blocage de la SDH par l'acide malonique entraîne essentiellement une accumulation de succinate.
- Toutes les objections que nous venons de faire contre la 1^{ère} hypothèse sont, par contre, en faveur de la seconde. Des preuves positives nous font cependant défaut pour démontrer une perte de spécificité du fluoracétate en milieu acide.

- La troisième hypothèse peut paraître la plus satisfaisante et c'est celle que nous retiendrons pour l'instant. Nous nous réserverons de revenir, par la suite, sur cette question lorsque nous aurons progressé plus avant dans l'étude des différents cycles susceptibles de réaliser l'oxydation de l'acétate. Il nous sera alors plus aisé de discuter de cette hypothèse qui implique le fonctionnement d'un autre mécanisme oxydatif de l'acétate capable de coexister ou de se substituer, à des degrés divers, au classique cycle de Krebs.

c) Inhibition par l'acide malonique

L'acide malonique est couramment utilisé comme inhibiteur du cycle de Krebs au niveau de la SDH depuis les travaux de QUASTEL (144) et de KREBS (107). On attribue généralement l'absence d'efficacité de l'acide malonique à sa non-dissociation (39). La forme non dissociée seule pourrait pénétrer les cellules pour parvenir au contact des centres actifs.

Nous avons utilisé l'acide malonique à pH 4 sur dialysat, étant dans l'impossibilité de l'utiliser sur latex à un tel pH.

α) Dans une première expérimentation, nous avons utilisé $1.10^{-3}M$ de malonate sur 4 homogénats de sérum-çulot dialysés contre un tampon pH 4 et pris comme critères le rendement de l'oxydation de l'acétate $2-C^{14}$ en $C^{14}O_2$ et la radioactivité du succinate. (Tableau 55)

Tableau 55 : INHIBITION DE L'OXYDATION DE L'ACETATE SUR DIALYSAT A pH 4 PAR $1.10^{-3}M$ DE MALONATE.

MOTIF Exp.	Rdt % oxydat. en $C^{14}O_2$				Radioact. ac. succin. (cpm)			
	1	2	3	4	1	2	3	4
TEMOIN	27	-	34	27	380	10	160	402
+ MALONATE $1.10^{-2}M$	21	1,9	11	2,5	420	630	1120	225
Incubation de 5 μCi d'acétate $2-C^{14}$ par ml de dialysat (3 heures à 30°C.) m.v. : - Exp. 1 B-3 - Exp. 2 B-1 - Exp. 3 B-5 - Exp. 4 B-3								

Il apparaît que le malonate est efficace à pH 4 pour inhiber, à des degrés divers selon les latex, l'oxydation de l'acétate $2-C^{14}$ et pour entraîner (3 cas sur 4) une accumulation d'acide succinique marqué.

β) Dans une deuxième expérimentation, nous avons utilisé cette fois une concentration croissante de malonate. Nous avons mesuré l'absorption d'oxygène en plus des 2 critères précédentes (Tableau 56).

- On constate une inhibition marquée de l'absorption d'oxygène dès une concentration de $5.10^{-3}M$ en malonate.

- L'oxydation de l'acétate est inhibée dès $5.10^{-3}M$ et peut atteindre 75 à 90 % pour $1.10^{-2}M$.

- Il apparaît une accumulation très nette de succinate marqué; cette accumulation passe par un maximum pour $1.10^{-2}M$ en malonate.

Tableau 56 : INHIBITION PAR UN TAUX CROISSANT DE MALONATE SUR DIALYSAT A pH 4.

MALONATE Concentration M/L		Absorption d'oxygène $\mu\text{L.}/\text{ml}/3\text{ h.}$	Rdt de l'oxydation en C^{14}O_2 (%)	Radioactivité ac. succinique (cpm)
Exp. 1	0	140	36	49
	1.10^{-3}	150	36	37
	5.10^{-3}	82	30	285
	1.10^{-2}	37	9,5	461
	$2,5.10^{-2}$	17	1,0	207
m.v. : B-5				
Exp. 2	0	380	68	0
	1.10^{-3}	180	78	1
	5.10^{-3}	70	18	257
	1.10^{-2}	50	8,2	365
	5.10^{-2}	40	8,3	218
m.v. : B-2				
Incubation de $5\ \mu\text{Ci}$ (Exp. 1) et de $2,5\ \mu\text{Ci}$ (Exp. 2) d'acétate 2-C^{14} par ml de dialysat (3 heures à 30°C)				

γ) Dans une troisième expérience, nous avons comparé l'inhibition par l'acide malonique de l'oxydation du succinate 2-3-C^{14} et de l'acétate 2-C^{14} en C^{14}O_2 sur des aliquotes d'un même dialysat à pH 4.

La figure 25 illustre les résultats de cette expérience. Il apparaît une bonne similitude entre l'inhibition de l'oxydation de ces 2 substrats.

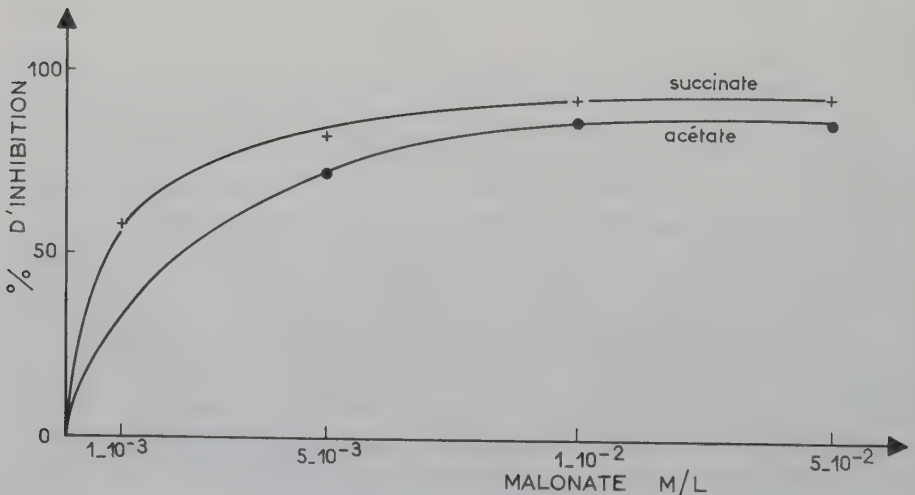


Figure 26 : INFLUENCE DE L'INHIBITION MALONIQUE SUR LE RENDEMENT DE L'OXYDATION DE L'ACETATE 2-C^{14} ET DU SUCCINATE 2-3-C^{14} EN C^{14}O_2 .

δ) Discussion

L'inhibition de l'oxydation de l'acétate (et du succinate marqué) par l'acide malonique à pH 4, jointe à l'accumulation de la radioactivité dans le succinate, ne laissent aucun doute sur le fonctionnement de la SDH dans les dialysats. Il n'a cependant pas été possible, dans nos conditions, de faire la contre-épreuve consistant à lever l'inhibition par un excès de succinate. Rappelons en effet que, notre critère majeur étant l'oxydation d'une petite quantité de substrat radioactif, on conçoit que l'apport de succinate aurait eu tout d'abord pour effet (comme nous l'avons vu précédemment, p. 98) de diluer, par compétition isotopique, le succinate radioactif synthétisé et donc, finalement, de réduire le rendement de l'oxydation du substrat radioactif introduit.

La bonne concordance entre l'inhibition de l'oxydation de l'acétate et du succinate laisse présager que la majorité, sinon la totalité, de l'acétate est oxydée via le succinate et que cette oxydation utilise la SDH.

d) Discussion

L'étude utilisant la compétition isotopique a permis de déceler, au sein des dialysats, la plupart des acides du cycle de Krebs; tous cependant ne semblent pas jouer le même rôle. Ainsi, alors qu'on peut douter que le citrate soit la première étape de l'utilisation de l'acétate dans son mécanisme oxydatif, notre attention a été attirée sur le succinate (et à un degré moindre sur le malate). En effet, le succinate s'accumule remarquablement par compétition isotopique et réduit nettement l'oxydation de l'acétate 2-C^{14} introduit. L'emploi de l'acide malonique a permis de déceler clairement le fonctionnement de la SDH et de montrer son rôle fondamental dans l'oxydation de l'acétate. Nous avons vu que l'utilisation du fluoracétate nous a conduits à penser à la possibilité d'un mécanisme oxydatif autre que le cycle de Krebs, susceptible de fonctionner en conjugaison avec lui ou même, éventuellement, de s'y substituer. Les considérations précédentes sur le rôle particulier de l'acide succinique laissent présager que celui-ci pourrait être la clef de ce mécanisme "shunt".

Le problème étant ainsi posé d'une façon générale, nous chercherons maintenant à définir plus précisément les mécanismes en jeu, au sein des dialysats de latex.

2 - Etude des mécanismes oxydatifs possibles

a) Introduction

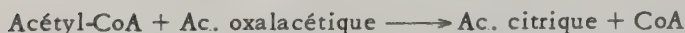
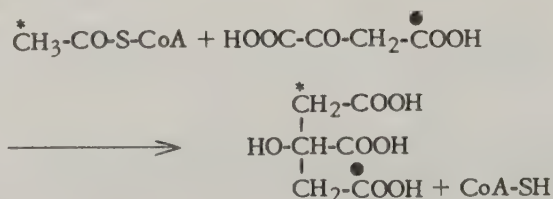
Nous allons maintenant considérer les divers mécanismes, connus à ce jour, susceptibles de permettre l'oxydation totale de l'acétate. Nous envisagerons successivement le cycle de Krebs, le cycle des diacides, le cycle glyoxylique et l'oxydation directe de l'acétate. Pour ce faire, nous discuterons de la présence dans le latex des différentes enzymes indispensables au fonctionnement de ces mécanismes. Il nous est évidemment impossible, dans le cadre de notre travail, d'isoler une à une ces enzymes; nous verrons cependant que, par un certain nombre d'expérimentations simples et par l'emploi judicieux de divers promoteurs marqués, il est possible, dans la majorité des cas, d'acquérir une certitude suffisante de leur présence.

b) Le cycle de Krebs

Le cycle de Krebs est, de loin, le mécanisme le plus universel permettant l'oxydation complète d'une molécule d'acétate en 2 molécules de CO_2 . Nous discuterons de la présence des enzymes nécessaires à son fonctionnement (Fig. 26)

α) Enzyme de condensation

Cette enzyme condensant l'acétyl-CoA sur l'oxalacétate est responsable de la synthèse du citrate.



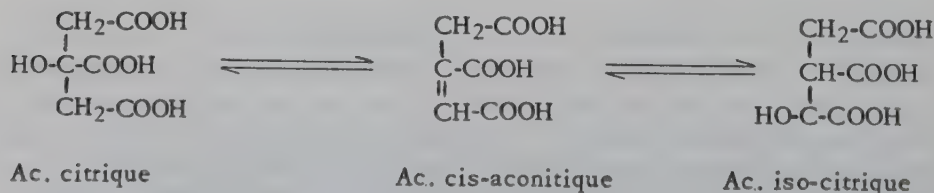
Les arguments suivants sont en faveur de la présence de cette enzyme dans le latex :

- L'acide citrique est, comme nous l'avons déjà vu, un des 2 acides organiques quantitativement les plus importants du latex. Il est aisément décelable par chromatographie sur papier ou sur colonne. Or, on ne connaît pas d'autre synthèse de cet acide que celle impliquant l'enzyme de condensation.
- Les incubations d'acétate 2-C^{14} sur latex conduisent, la plupart du temps, à une radioactivité importante dans le citrate sans qu'il soit toutefois possible d'accumuler la radioactivité dans le citrate par compétition isotopique sur latex, alors qu'on peut parfois le faire sur dialysat.
- Des incubations de C^{14}O_2 sur latex permettent de déceler une radioactivité importante dans le citrate; nous verrons plus loin qu'il faut l'attribuer à la bêta-carboxylation du pyruvate en oxalacétate. En l'occurrence, c'est l'oxalacétate qui est marqué, et non plus l'acétate, dans la condensation conduisant au citrate.

Tout porte donc à croire à la présence de l'enzyme de condensation dans le latex d'hévéa.

β) Aconitase

L'aconitase est l'enzyme responsable des isomérisations qui permettent de passer du citrate au cis-aconitate et de celui-ci à l'isocitrate



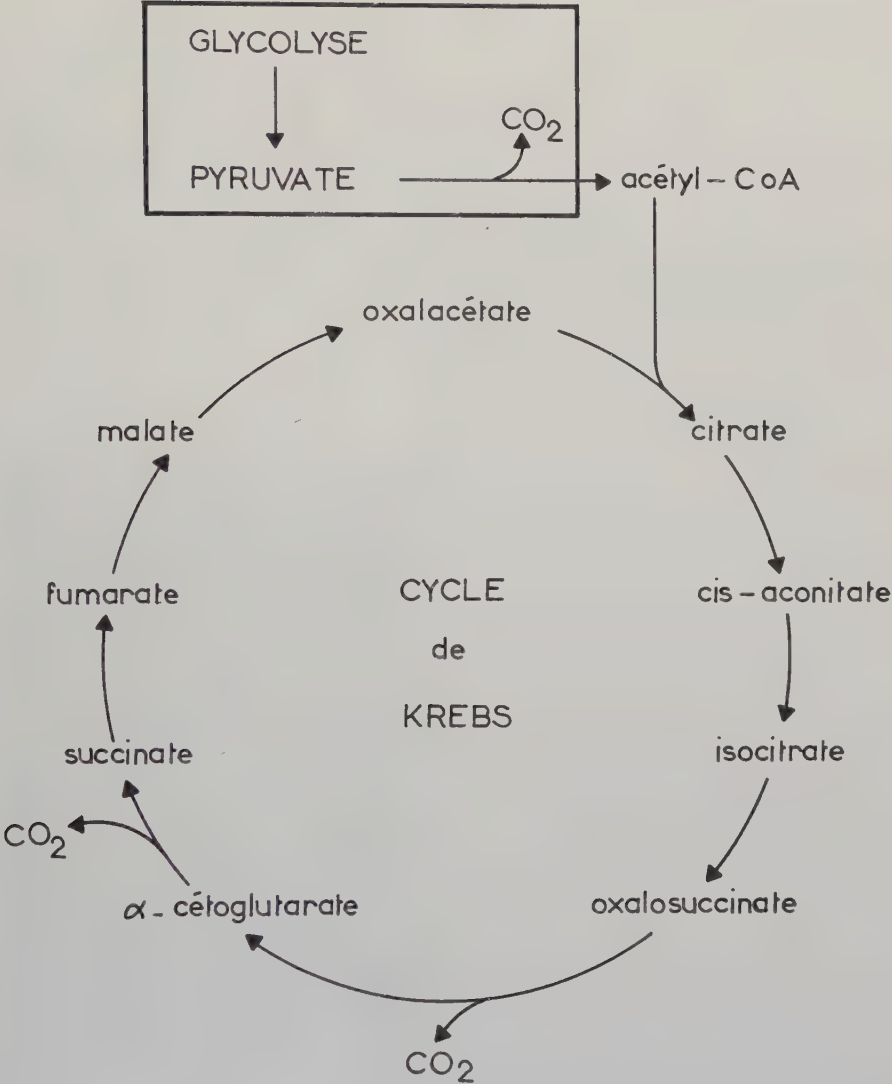


Figure 27 : FONCTIONNEMENT DU CYCLE DE KREBS

Il ne nous a jamais été possible à ce jour de déceler directement dans le latex la présence de cis-aconitate et d'isocitrate; de plus, nous n'avons pas réussi à mettre en évidence ces acides, par compétition isotopique, en présence d'acétate 2-C^{14} (ni sur latex, ni sur dialysat). Cependant, un certain nombre d'arguments sont en faveur de la présence de l'aconitase :

- L'accumulation remarquable de citrate marqué après incubation d'acétate 2-C^{14} sur dialysat en présence de fluoracétate démontre indirectement le fonctionnement de l'aconitase.
- L'aconitate radioactif a pu être très clairement mis en évidence après incubation de citrate 1-5-C^{14} sur dialysat (figure 28), avec ou sans compétition isotopique au niveau de l'aconitase.
- Si nous avons pu montrer précédemment que l'oxydation de l'acétate ne semble guère dépendre de l'aconitase, des incubations de citrate 1-5-C^{14} ont permis de constater que celui-ci était oxydé en C^{14}O_2 avec un rendement supérieur à celui de l'acétate (Tableau 57).

(Incubation de 2,5 microc. de Citrate 1-5-C^{14} /ml de dialysat + 1.10^{-2}M d'aconitate, 3 heures à 30°C .)

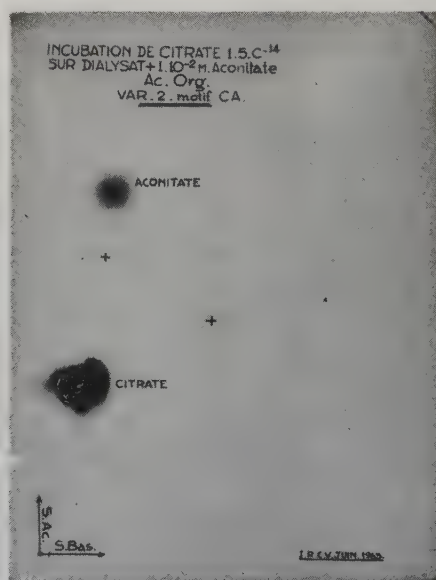


Figure 28 : MISE EN EVIDENCE DE L'ACONITATE PAR COMPETITION ISOTOPIQUE SUR UNE INCUBATION DE CITRATE RADIOACTIF.

Cet argument est évidemment en faveur du fonctionnement de l'aconitase bien qu'il ne faille pas négliger, comme nous le verrons plus loin, la possibilité d'un clivage du citrate en ses constituants : l'acétate et l'oxalacétate.

Nous sommes donc en droit de considérer comme suffisamment démontrée la présence de l'aconitase au sein du latex.

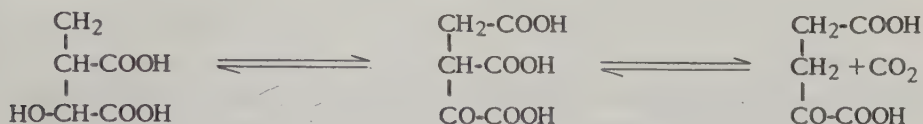
Tableau 57 : OXYDATION COMPAREE DE L'ACETATE 2-C¹⁴
ET DU CITRATE 1-5-C¹⁴ SUR UN MEME DIALYSAT.

SUBSTRAT	Rendement de l'oxydation en C ¹⁴ O ₂ (%)			
	Exp. 1 m.v. : P-1	Exp. 2 m.v. : P-1	Exp. 3 m.v. : B-4	MOYENNES
ACETATE 2-C ¹⁴	10	7,8	59	25,6
CITRATE 1-5-C ¹⁴	12	25	75	37,3

Incubation de 2,5 μ Ci d'acétate 2-C¹⁴ ou de 2,5 μ Ci de citrate 1-5-C¹⁴ par ml de dialysat (3 heures à 30° C.)

y) Deshydrogénase isocitrique - décarboxylase oxalosuccinique.

L'activité de cette enzyme conduit à la synthèse de l'alpha-cétoglutarate dont la présence a été considérée comme test de leur activité



L'acide alpha-cétoglutarique n'existe pas dans le latex en quantité suffisante pour qu'il soit généralement possible de le détecter clairement par chromatographie sur papier ou sur colonne de l'acide libre.

Cependant, nous avons réussi à le mettre en évidence :

- par chromatographie sur papier de sa 2-4-dinitrophénylhydrazone (2-4-DNPH);
- par compétition isotopique sur dialysat après incubation d'acétate 2-C¹⁴ et chromatographie, soit de l'acide libre, soit de sa 2-4-DNPH;
- après incubation de citrate 1-5-C¹⁴ sur dialysat, avec ou sans compétition isotopique, soit sous forme libre, soit sous forme de 2-4-DNPH.

De plus l'acide glutamique radioactif est susceptible de s'accumuler remarquablement, par compétition isotopique, sur dialysat, après incubation d'acétate 2-C¹⁴. On serait en droit de considérer qu'il résulte de la classique transamination de l'alpha-cétoglutarate et d'en déduire la présence des enzymes permettant la synthèse de l'alpha-cétoglutarate. Toutefois, on ne tient pas compte ainsi de la synthèse du glutamate via le citra-malate, mise en évidence par LOSADA (111) chez des bactéries photosynthétiques et que JOLCHINE (99) pense être opérante chez BRYOPHYLLUM DAIGREMON-TIANUM.

Tous ces arguments convergent néanmoins pour faire admettre la présence de la déshydrogénase isocitrique et de la décarboxylase oxalosuccinique.

δ) La déshydrogénase de l'acide l'α-cétoglutarique

La déshydrogénase de l'acide alpha-cétoglutarique, associée à une enzyme libérant le CoA de succinyl-CoA avec synthèse d'une molécule d'ATP, conduit au succinate.



Rappelons que cette enzyme a été précédemment décelée sur latex (151); le succinate est présent dans le latex en quantité trop réduite pour être mis clairement en évidence par les méthodes habituelles. Toutefois, un certain nombre d'arguments militent en faveur de la présence de la déshydrogénase qui normalement le synthétise.

- Dès les premières incubations d'acétate 2-C¹⁴ sur latex et sur dialysat, le succinate marqué a été décelé par chromatographie sur papier.
- Comme nous l'avons vu précédemment, le succinate est susceptible de s'accumuler remarquablement, par compétition isotopique, après incubation d'acétate 2-C¹⁴ (voir plus haut p. 161 et aussi tableau 58).
- Il est possible d'accumuler du succinate, par compétition isotopique, après incubation de citrate 1-5-C¹⁴.
- Des incubations d'alpha-cétoglutarate 5-C¹⁴ ont également permis de déceler le succinate radioactif.

Tableau 58 : ACCUMULATION DU SUCCINATE RADIOACTIF PAR
COMPETITION ISOTOPIQUE APRES INCUBATION
D'ACETATE 2-C¹⁴ SUR DIALYSAT.

SUCCINATE Concentration M/L	Radioactivité du succinate (cpm)	
	Exp. 1 m.v. : B-2	Exp. 2 m.v. : P-1
0	22	139
5.10 ⁻³	1.314	800
1.10 ⁻²	1.566	874
5.10 ⁻²	1.224	576
1.10 ⁻¹	1.047	323
Incubation de 5 µCi d'acétate 2-C ¹⁴ par ml de dialysat (3 heures à 30°C.)		

De ces 4 arguments, les 2 derniers sont certainement les plus convaincants, car l'activité de l'isocitritase et celle de l'enzyme permettant la réaction de THUNBERG-KNOOP sont également susceptibles de conduire, en partant d'acétate 2-C¹⁴, au succinate radioactif. Ces 2 enzymes seront étudiées par la suite; on peut toutefois admettre d'ores et déjà que la transformation du citrate, et surtout de l'alpha-cétoglutarate, en succinate sont des preuves suffisantes du fonctionnement de la déshydrogénase de l'acide alpha-cétoglutarique.

ξ) La succino-deshydrogénase (SDH.)

Cette enzyme est responsable de l'oxydation du succinate en fumarate et son fonctionnement est lié à la chaîne des cytochromes.



Nous avons déjà mis en évidence la SDH au sein des dialysats grâce à son inhibition par l'acide malonique. Nous donnerons rapidement quelques arguments supplémentaires.

Bien que le fumarate ne soit pas présent en quantité décelable sur latex, on est obligé d'admettre le fonctionnement de la SDH pour les raisons suivantes :

1°) Des incubations de succinate 2-3-C¹⁴ sur latex ont permis de déceler des quantités importantes de malate radioactif, ce qui implique le passage par la SDH.

2°) L'incubation de succinate 2-3-C¹⁴ sur dialysat conduit à un faible marquage du fumarate (qui n'a donc pas tendance à s'accumuler).

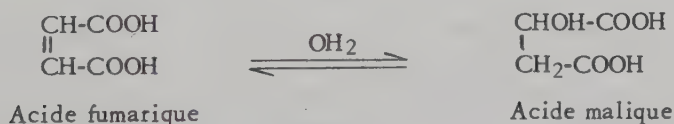
3°) Des incubations de fumarate 2-3-C¹⁴ sur dialysat ont permis de déceler une radioactivité importante dans le succinate, ce qui implique un certain fonctionnement de la SDH dans le sens des réductions.

4°) Tandis qu'il est impossible d'accumuler le fumarate marqué, par compétition isotopique sur latex, après incubation d'acétate 2-C¹⁴, il est, par contre, aisé de le faire sur dialysat, après compétition par le succinate ou le fumarate.

Toutes ces raisons ne peuvent laisser aucun doute quant à la présence de la SDH au sein du latex. Remarquons cependant que son fonctionnement paraît plus intense sur dialysat que sur latex.

ζ) La fumarase

La fumarase permet la fixation d'une molécule d'eau sur le fumarate et conduit à l'acide malique



La présence d'une quantité importante de malate au sein du latex, aisément décelable par les techniques classiques, pourrait être considérée comme une preuve de la présence de la fumarase si l'on pouvait négliger la synthèse du malate par réduction de l'oxalacétate ou directement par l'enzyme malique.

Les résultats suivants sont toutefois en faveur de la présence de la fumarase :

- L'incubation de fumarate 2-3-C¹⁴ sur dialysat permet de mettre en évidence une radioactivité importante dans le malate.
- L'incubation de succinate 2-3-C¹⁴ sur latex conduit également à une radioactivité intense dans le malate.

- Lors des incubations d'acétate 2-C^{14} sur dialysat, on peut parfois, par compétition isotopique, accumuler une certaine radioactivité dans le malate (Tableau 59).

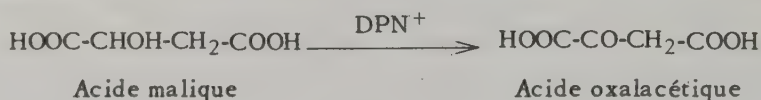
Tableau 59 : ACCUMULATION DE MALATE RADIOACTIF PAR COMPE-TITION ISOTOPIQUE APRES INCUBATION D'ACETATE* SUR DIALYSAT.

MOTIF	Radioactivité du malate en cpm		
	Exp. 1 m.v.: B-3	Exp. 2 m.v.: P-1	Exp. 3 m.v.: B-2
TEMOIN	16	30	0
MALATE : 5.10^{-3}M	28	65	56
1.10^{-2}	32	73	79
5.10^{-2}	97	369	546
1.10^{-1}	243	371	443
Incubation de $5\text{ }\mu\text{Ci}$ d'acétate 2-C^{14} par ml de dialysat (3 heures à 30°C.)			

Cet ensemble de faits montre donc clairement l'existence de la fuma-rase dans le latex.

η) La deshydrogénase malique

En présence de DPN^+ la deshydrogénase malique oxyde l'acide malique en oxalacétate



L'acide oxalacétique est un acide cétonique particulièrement labile et présent vraisemblablement en quantité réduite. Il n'a pas été possible de le décèler clairement par les méthodes habituelles.

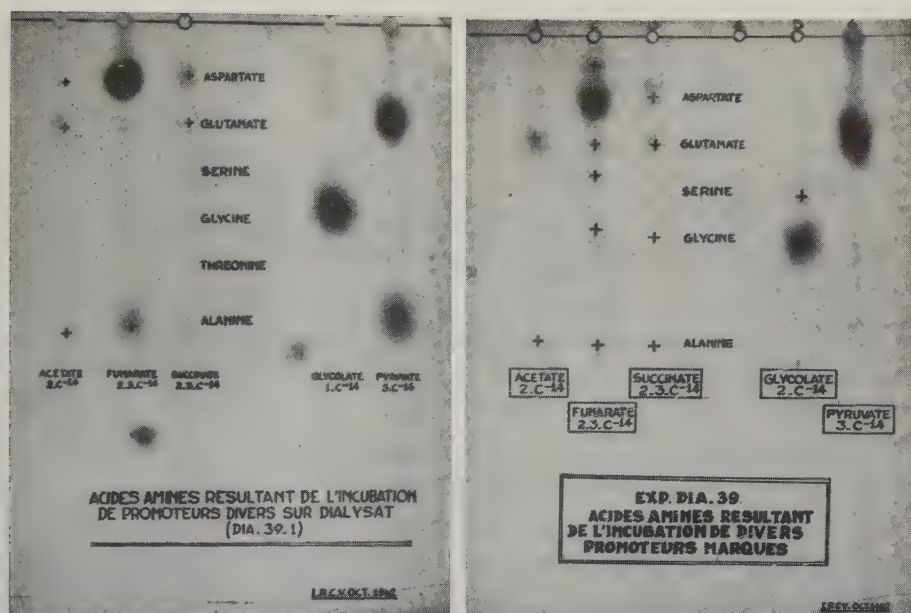
Un certain nombre d'expériences sont, plus ou moins directement, en faveur de la présence de la deshydrogénase malique :

- Des incubations de fumarate $2\text{-}3\text{-C}^{14}$ sur dialysat en présence de glutamate, d'aspartate et d'alanine ont permis de constater une radioactivité importante dans l'acide aspartique; or, on sait que l'aspartate résulte normale-ment de la transamination de l'oxalacétate (tableau 60).

Tableau 60 : RADIOACTIVITE DE L'ASPARTATE APRES INCUBATION DE FUMARATE $2\text{-}3\text{-C}^{14}$ SUR DIALYSAT.

	Radioactivité de l'aspartate en cpm		
	Exp. 1 m.v.: B-3	Exp. 2 m.v.: P-1	Exp. 3 m.v.: W-1
Incubation de $5\text{ }\mu\text{Ci}$ de fuma-rate $2\text{-}3\text{-C}^{14}$ par ml de dia-lysat, en présence d'alanine, d'acides aspartique et gluta-mique 1.10^{-2}M	1.737	2.045	575

- Des incubations de succinate et de fumarate 2-3-C¹⁴ sur dialysat ont également permis de déceler une certaine radioactivité dans l'aspartate (figures 28 et 29).
- En incubant du malate 2-3-C¹⁴ sur dialysat, on a pu mettre en évidence que la 2-4-dinitrophénylhydrazone de l'oxalacétate était radioactive.

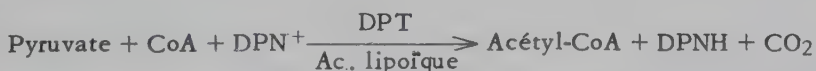


(Incubation de 5 μ Ci de chacun des substrats/ml de dialysat, 3h à 30°C). On remarquera que dans ces 2 exp. le pyruvate conduit à une accumulation remarquable de la radioactivité dans le glutamate, ce qui pourrait laisser présager une synthèse de celui-ci via le citramalate (111).

Figures 29 et 30 : ACIDES AMINES RADIOACTIFS RESULTANT DE L'INCUBATION DE DIVERS SUBSTRATS MARQUES SUR 2 DIALYSATS DIFFERENTS.

θ) La décarboxylase pyruvique

La décarboxylation oxydative du pyruvate en acétate est une réaction complexe nécessitant la présence d'un certain nombre de cofacteurs dont le pyrophosphate de thiamine (DPT), le CoA, l'acide lipoiqne et le DPN⁺, le produit final de cette réaction étant l'acétyl-CoA.



Cette réaction est, en fait, hors du cycle de Krebs. Rappelons que c'est une des rares réactions à avoir été mise en évidence dans des travaux antérieurs (153).

Nous avons démontré le fonctionnement de cette enzyme sur latex et sur dialysat, tout d'abord, en mesurant la décarboxylation du pyruvate $1-C^{14}$

au manomètre de Warburg. Pour ce faire, nous avons simplement déterminé le $C^{14}O_2$ libéré (Tableau 61).

Tableau 61 : RENDEMENT DE LA TRANSFORMATION DU PYRUVATE $1-C^{14}$ ET DE L'ACÉTATE $2-C^{14}$ EN $C^{14}O_2$.

MILIEU	SUBSTRAT	Rendement de l'oxydation en C ¹⁴ O ₂ (%)		
		Exp. 1 m.v. : W-2	Exp. 2 m.v. : P-4	Exp. 3 m.v. : B-4
LATEX	ACETATE 2-C ¹⁴	2,1	3,0	2,8
	PYRUVATE 1-C ¹⁴	19	3,7	74
DIALYSAT	ACETATE 2-C ¹⁴	24	24	4,4
	PYRUVATE 1-C ¹⁴	19	25	78
Incubation de 2,5 μCi d'acétate 2-C ¹⁴ , ou de pyruvate 1-C ¹⁴ par ml de milieu, 3 heures à 30° C.				

Il apparaît que, sur latex comme sur dialysat, le pyruvate $1-C^{14}$ est susceptible de libérer son carbone carboxylique avec des rendements variables pouvant être relativement élevés.

Par ailleurs, le fait que le pyruvate $3-C^{14}$ incubé sur latex conduise à un caoutchouc radioactif implique sa décarboxylation en acétate.

22 incubations comparées d'acétate $2-C^{14}$ et de pyruvate $3-C^{14}$, effectuées sur des latex différents, ont permis de constater que le rendement de l'incorporation de la radioactivité dans le caoutchouc était en moyenne de 5,53 % pour l'acétate et de 0,06 % pour le pyruvate. Ce rendement, bien que faible, confirme le fonctionnement de la décarboxylase pyruvique.

i) Discussion

Nous venons de voir que toutes les enzymes nécessaires au fonctionnement du cycle de Krebs sont présentes au sein du latex. Remarquons toutefois que la plupart n'ont pu être décelées directement sur latex, mais qu'il a fallu utiliser des dialysats, ce qui n'est pas sans sous-entendre une certaine inhibition de leur fonctionnement sur latex.

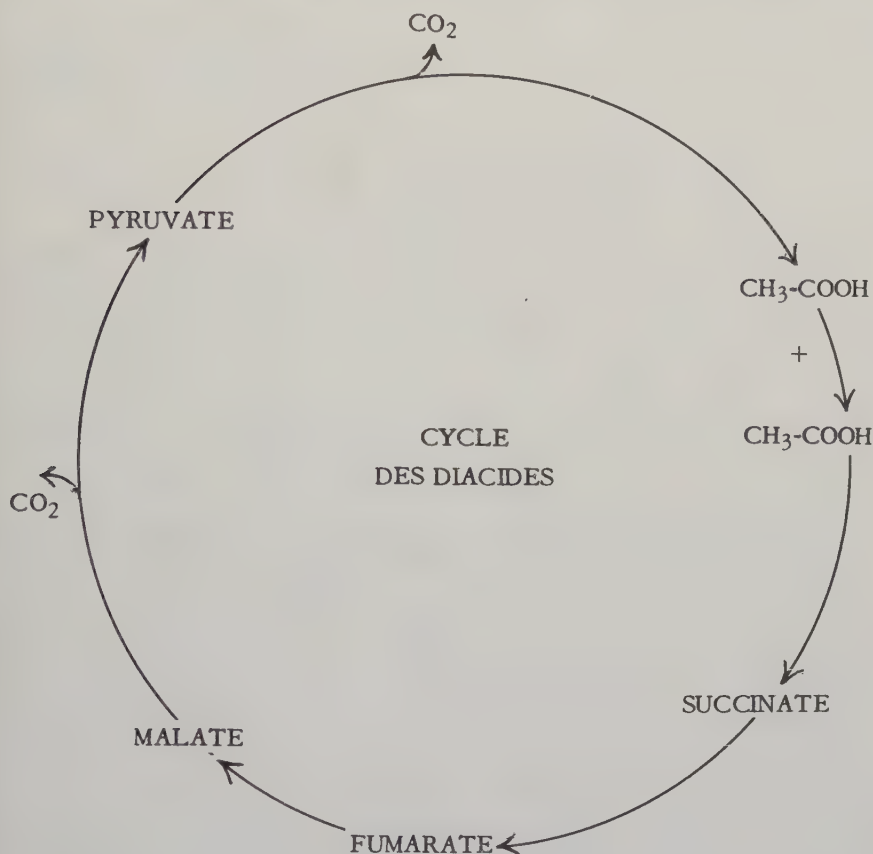
La présence de toutes ces enzymes n'implique pas qu'elles fonctionnent simultanément; c'est seulement lorsque toutes les possibilités d'oxydation de l'acétate auront été examinées qu'il sera réellement possible de discuter de la nature du mécanisme oxydatif effectif.

Nous noterons enfin les différences remarquables de l'activité de la décarboxylase pyruvique, suivant le latex, et nous garderons présente à l'esprit cette variabilité en tant que facteur susceptible d'influer sur la biogénèse du caoutchouc.

c) Le cycle des diacides

Le cycle des diacides a été proposé initialement par THUNBERG et WIELAND (177) (194) pour rendre compte du pouvoir de certaines bactéries, algues ou champignons, de subsister avec l'acétate comme seule source d'énergie.

Ce cycle est basé sur la condensation oxydative de 2 molécules d'acétate pour donner 1 molécule de succinate. Cette réaction est appelée souvent "condensation de THUNBERG" ou encore de "KNOOP THUNBERG".



Toutes les enzymes de ce cycle sont connues; seule, la réalité de l'enzyme de condensation elle-même reste quelque peu aléatoire.

Signalons, cependant, que SEAMAN (159) (160) a montré, chez *TETRAHYMENA PYRIFORMIS*, l'existence d'une enzyme susceptible de cliver le succinate, selon la réaction :

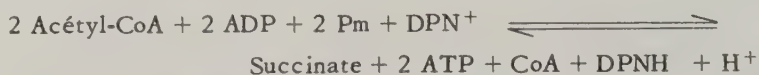


Un certain nombre de chercheurs ont invoqué le cycle des diacides pour expliquer l'oxydation de l'acétate dans des conditions où le cycle de Krebs et le shunt glyoxylique ne rendent pas compte, en totalité ou partiellement, des faits expérimentaux. Citons AJL et KAMEN (2), WIELAND et SONDERHOFT (193), TOPPER, et STETTEN (179), BARRON, ARDAO et HEARON (36), DAGLEY, DAWES et MORRISON (59), et, plus près de nous, JOLCHINE (99).

Le fonctionnement du cycle des diacides repose, outre la condensation de THUNBERG, sur un certain nombre d'enzymes dont plusieurs sont communes avec le cycle de Krebs. Nous discuterons, ici, seulement des enzymes qui lui sont propres.

α) Enzyme permettant la condensation de THUNBERG

Si on se réfère aux travaux de SEAMAN (160), la réaction serait exergonique dans le sens de la synthèse du succinate et nécessiterait que l'acétate soit sous forme d'acétyl-CoA



La mise en évidence du fonctionnement d'une telle enzyme est extrêmement difficile dans un milieu complexe et nécessiterait la séparation préalable de l'enzyme. Néanmoins, en travaillant sur un latex ou sur un dialysat, nous avons pu obtenir un certain nombre d'éléments en faveur de cette réaction :

- En examinant des radiochromatographies provenant d'incubations d'acétate 2-C¹⁴ sur 154 latex, il est apparu que, dans 55 cas, la radioactivité du succinate était nettement plus intense que celle du citrate (Tableau 62).

Tableau 62 : COMPARAISON DE LA RADIOACTIVITE DU CITRATE ET DU SUCCINATE DANS 154 LATEX DIFFERENTS, APRES INCUBATION DE 5 μCi D'ACETATE 2-C¹⁴ PAR ml DE LATEX.

Radioactivité en cpm					
Succinate > Citrate (55 cas)		Succinate = Citrate (9 cas)		Succinate < Citrate (90 cas)	
123	51	44	43	46	124

Ces chiffres ont été obtenus après 3 heures d'incubation; on peut penser qu'après une telle durée, tous les équilibres ont eu le temps de s'établir. Nous avons introduit 0,5 micromol/ml d'acétate 2-C¹⁴, tandis que le latex contenait en moyenne 50 micromol/ml de citrate. Dans ces conditions, il paraît très improbable que la très petite quantité de citrate marqué synthétisée ait pu franchir la barrière de la compétition isotopique massive au niveau du citrate, pour conduire, dans 55 cas sur 154, à une radioactivité du succinate très supérieure à celle du citrate. On en est amené à supposer que le succinate a été synthétisé par une voie plus directe que celle impliquant le cycle de Krebs, depuis l'enzyme de condensation jusqu'à la deshydrogénase de l'acide alphacétoglutarique.

- Nous avons vu précédemment que, de tous les acides du cycle de Krebs, le succinate est celui susceptible de s'accumuler de la façon la plus spectaculaire par compétition isotopique, et qu'il possède l'action dépressive la plus systématique sur le rendement de l'oxydation de l'acétate 2-C¹⁴ en C¹⁴O₂ (fig. 21 et Tableau 49)

Ces résultats peuvent être également interprétés comme étant très en faveur d'une synthèse directe du succinate, qui serait, en fait, la voie d'introduction de l'acétate dans les cycles oxydatifs.

- Si le succinate radioactif découle du fonctionnement normal du cycle de Krebs, après introduction de l'acétate 2-C^{14} dans le citrate, on est en droit de penser que l'apport d'une quantité importante de citrate doit réduire, par compétition isotopique, la radioactivité incorporée dans le succinate. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons incubé l'acétate 2-C^{14} sur dialysat, avec ou sans citrate et avec ou sans compétition isotopique par apport de succinate (Tableau 63).

Tableau 63 : INFLUENCE DU CITRATE SUR LA RADIOACTIVITE DU SUCCINATE.

Expérience	Motif	Concentration M/L		Radioactivité du succinate en cpm
		Citrate	Succinate	
1 m.v. : W-1	T	0	0	290
	1	5.10^{-2}	0	365
	2	0	1.10^{-2}	315
	3	5.10^{-2}	1.10^{-2}	330
2 m.v. : B-1	T	0	0	170
	1	5.10^{-2}	0	355
	2	0	1.10^{-2}	365
	3	5.10^{-2}	1.10^{-2}	360
3 m.v. : P-1	T	0	0	480
	1	5.10^{-2}	0	1.060
	2	0	1.10^{-2}	1.220
	3	5.10^{-2}	1.10^{-2}	1.240
Incubation de 5 μCi d'acétate 2-C^{14} /ml de dialysat (3 heures à 30°C .)				

Il ressort clairement du tableau 63 que l'apport de citrate, avec ou sans compétition isotopique au niveau du succinate, n'a aucun effet dépressif sur la synthèse du succinate.

Nous avons confirmé ces résultats en réalisant une expérience, également sur dialysat, mais dans laquelle l'incubation d'acétate 2-C^{14} a été faite en présence d'un taux croissant de citrate (Tableau 64).

Tableau 64 : INFLUENCE D'UN TAUX CROISSANT DE CITRATE SUR LA RADIOACTIVITE DU SUCCINATE RESULTANT DE L'INCUBATION D'ACETATE 2-C^{14} SUR DIALYSAT.

CITRATE Concentration M/L	Radioactivité du succinate en cpm		
	Exp. 1 m.v. : B-3	Exp. 2 m.v. : P-1	Exp. 3 m.v. : B-2
0	40	140	20
5.10^{-3}	105	275	30
1.10^{-2}	215	325	35
5.10^{-2}	410	330	140
1.10^{-1}	570	305	290
Incubation de 5 μCi d'acétate 2-C^{14} par ml de dialysat (3 heures à 30°C)			

Les résultats sont en accord avec ceux donnés dans le précédent tableau. Ils confirment, par ailleurs, une tendance apparue précédemment : le citrate aurait un effet positif, au moins jusqu'à un certain point, sur la synthèse du succinate.

Ces 2 expériences sont donc en faveur d'une synthèse directe du succinate, excluant le passage par le citrate.

- Nous avons constaté précédemment (p. 101) qu'à pH 7, le fluoracétate, bien que n'agissant pas sur le rendement de l'oxydation de l'acétate 2-C^{14} en C^{14}O_2 , était susceptible d'accumuler le citrate de façon remarquable. Si la radioactivité du succinate découle du fonctionnement normal du cycle de Krebs, après introduction de l'acétate marqué dans le citrate, on est en droit d'attendre du fluoracétate que, bloquant l'aconitase, il réduise considérablement la radioactivité du succinate. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons incubé sur dialysat, à pH 7, de l'acétate 2-C^{14} , en présence d'un taux croissant de fluoracétate et d'une quantité fixe de succinate, afin d'accumuler le succinate marqué par compétition isotopique (Tableau 65).

Tableau 65 : INFLUENCE DU FLUORACETATE SUR LA SYNTHÈSE DU SUCCINATE RADIOACTIF.

MOTIF	Concentration M/L		Rendement oxydation acétate* en C^{14}O_2	Radioact. ac. organ.	
	FLUORACETATE	SUCCINATE		Citrate cpm	Succinate cpm
T	0	1.10^{-2}	41 %	7	340
1	1.10^{-3}	1.10^{-2}	38	40	290
2	5.10^{-3}	1.10^{-2}	42	100	375
3	1.10^{-2}	1.10^{-2}	43	200	355
4	5.10^{-2}	1.10^{-2}	42	470	345
Incubation de $2,5 \mu\text{Ci}$ d'acétate 2-C^{14} par ml de dialysat (3 heures à 30°C .) m.v. : B-1					

L'accumulation de citrate radioactif en fonction du taux de fluoracétate montre bien une certaine inhibition de l'aconitase. L'absence d'action du fluoracétate sur la synthèse du succinate radioactif (comme sur le rendement de l'oxydation de l'acétate) montre qu'il est fort peu vraisemblable que la synthèse du succinate (comme l'oxydation de l'acétate) passe par le citrate et soit liée au fonctionnement de l'aconitase.

- On sait que le cycle de Krebs, après un nombre élevé de tours, conduit à un rapport de l'ordre de 2,3 pour la radioactivité des carbones méthyléniques et carboxyliques du succinate, tandis que le cycle des diacides conduit normalement à une valeur plus élevée de ce rapport. Nous avons récupéré, par élution de chromatogrammes, du succinate marqué résultant d'incubation d'acétate 2-C^{14} : trois lots de succinate marqué ont été ainsi constitués correspondant à des latex et à des périodes d'incubations différentes. Après purification par séparation sur échangeurs d'ions, nous avons dégradé deux lots par pyrolyse du succinate de baryum (108) et le 3^e par la réaction de SCHMIDT (73) (136) (Tableau 66).

Tableau 66

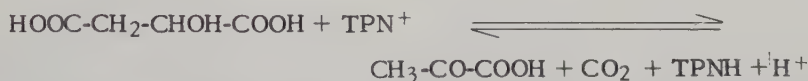
	Lot 1	Lot 2	Lot 3
% Radioactivité C ₁ + C ₄	19,3	13,2	20,2
% Radioactivité C ₂ + C ₃	80,6	86,8	79,8
Rapport des $\frac{C_2 + C_3}{C_1 + C_4}$ radioactivités	4,2	6,6	3,9
- Exp. 1 et 2 : Pyrolyse		- Exp. 3 : Réaction de SCHMIDT	

Dans tous les cas, la valeur du rapport des radioactivités en % trouvées dans les carbones méthyléniques et carboxyliques est plus en faveur d'une synthèse directe du succinate que du fonctionnement normal du cycle de Krebs.

- Il est évident que la méthode la plus démonstrative pour mettre en évidence l'enzyme permettant la condensation de THUNBERG, consisterait à isoler cette enzyme. Une telle expérimentation sortant du cadre de nos travaux, nous avons dû nous contenter de réunir certains faits expérimentaux qui, tous, tendent à montrer la présence d'une voie directe permettant la synthèse du succinate.

β) Enzyme malique

Cette enzyme effectue la décarboxylation oxydante du malate en pyruvate :



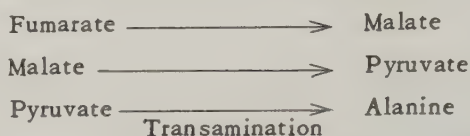
Diverses expériences sont en faveur de l'existence de cette enzyme.

- Après incubation d'acétate 2-C¹⁴ sur dialysat, il est possible de déceler la présence d'acide pyruvique marqué sous forme de 2-4-dinitrophénylhydrazone.
- L'incubation de fumarate 2-3-C¹⁴ sur dialysat, en présence d'alanine, d'acide glutamique et d'acide aspartique, permet de mettre en évidence une certaine partie de la radioactivité dans l'alanine (Tableau 67 et fig. 27).

Tableau 67 : RADIOACTIVITE DES ACIDES AMINES RESULTANT DE L'INCUBATION DE FUMARATE 2-3-C¹⁴ SUR DIALYSAT.

Expérience	Radioactivité des acides aminés en cpm		
	Alanine	Ac. glutamique	Ac. aspartique
1 m.v. : B-3	95	100	1.735
2 m.v. : P-1	130	60	2.045
3 m.v. : W-1	30	15	570
Incubation de 5 μCi de fumarate 2-3-C ¹⁴ /ml de dialysat (3 heures à 30°C.)			

On peut penser que la radioactivité retrouvée dans l'alanine découle de la chaîne de réactions suivantes :



La faible proportion de radioactivité retrouvée dans l'alanine, par rapport à celle de l'aspartate, conduit cependant à penser qu'en l'occurrence, l'oxydation du malate en oxalacétate l'emporte largement sur la décarboxylation oxydative en pyruvate.

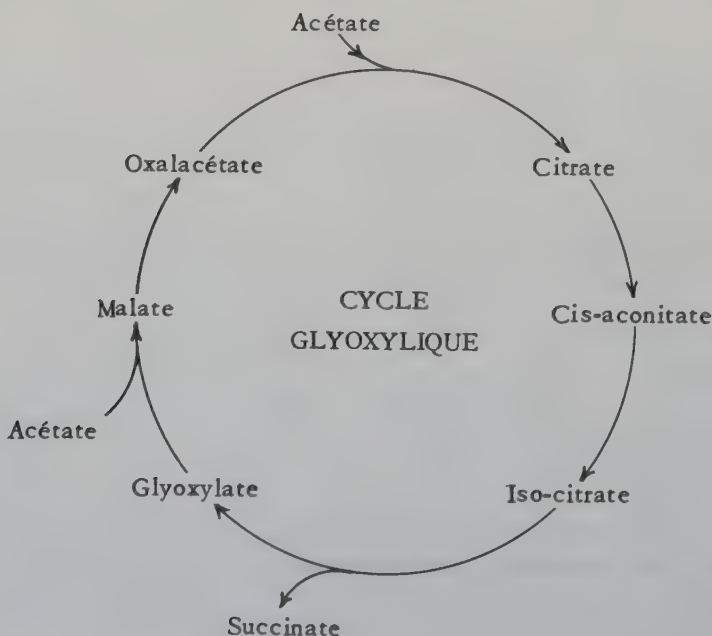
- La synthèse d'une quantité importante de malate radioactif par incubation de $C^{14}O_2$ pourrait être considérée comme une preuve du fonctionnement de l'enzyme malique dans le sens des carboxylations, s'il n'existait la possibilité que cette synthèse ne passe par l'oxalacétate.

γ) Discussion

Bien que des arguments supplémentaires seraient certainement utiles pour démontrer la présence de l'enzyme malique, on a pu voir que tout un faisceau d'éléments sont en faveur d'une synthèse directe du succinate. On a tout lieu de penser que cette synthèse procède par la réaction de THUNBERG-KNOOP.

d) Le cycle glyoxylique

KORNBERG et KREBS (105) ainsi que KORNBERG et MADSEN (106) établirent, en 1956 et 1957, l'existence d'un cycle différent du cycle de Krebs, auquel ils donnèrent le nom de cycle glyoxylique ou de shunt glyoxylique. Cette dernière dénomination tend à montrer qu'il s'agit, en fait, d'un raccourci du classique cycle de Krebs :



On voit que ce cycle utilisant 2 acétates et une quantité catalytique d'oxalacétate conduit à la synthèse d'une molécule de succinate.

Remarquons qu'il implique le fonctionnement de l'enzyme de condensation, de l'aconitase, de la deshydrogénase malique et de deux enzymes qui lui sont propres, à savoir l'isocitritase susceptible de cliver l'isocitrate en glyoxylate et succinate, et la malate synthétase condensant le glyoxylate et l'acétate pour donner le malate.

Avant de discuter de la présence de ces 2 enzymes, nous citerons les faits expérimentaux qui nous ont amené à songer à la présence de ce cycle.

α) Expériences préliminaires

Ayant effectué un certain nombre d'incubations d'acétate 2-C^{14} sur dialysat, en présence de glyoxylate, nous avons très souvent constaté une augmentation très sensible du rendement de l'oxydation en C^{14}O_2 de l'acétate 2-C^{14} (Tableau 68).

Tableau 68 : INFLUENCE DE L'APPORT DE GLYOXYLATE SUR LE RENDEMENT DE L'OXYDATION DE L'ACETATE 2-C^{14} .

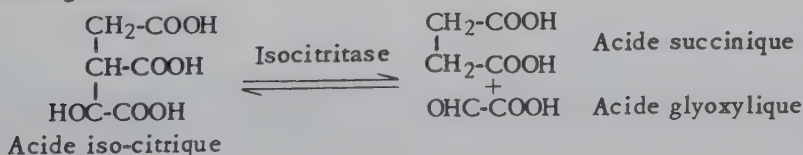
MOTIF Exp.	Rdt de l'oxydation Acétate 2-C^{14} en C^{14}O_2 (%)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
TEMOIN + GLYOXYLATE 1.10^{-2}M	24	0,4	2,0	43	2,4	12	30	7,3	1,7	13
	34	1,4	2,5	48	4,0	7,4	45	13	2,1	28
m.v. :	P-2	B-2	B-2	B-3	B-3	B-1	B-5	B-5	B-7	B-1
Incubation de $5\text{ }\mu\text{Ci}$ d'acétate 2-C^{14} par ml de dialysat (3 heures à 30°C .)										

Cette action du glyoxylate n'a toutefois pas été retrouvée dans quelques expériences du même type, réalisées quelques mois plus tard. Faut-il voir là un exemple de la variabilité des propriétés du latex sous des influences encore totalement incontrôlées ?.

La première hypothèse venant à l'esprit pour expliquer l'effet positif du glyoxylate sur l'oxydation de l'acétate, est de faire intervenir la condensation de l'acétate et du glyoxylate par la malate synthétase. Une telle condensation implique que le glyoxylate peut être facteur limitant de l'oxydation de l'acétate; elle est donc susceptible d'expliquer que l'apport de glyoxylate est capable d'entraîner la combustion d'une quantité d'acétate supérieure à celle utilisée en son absence et brûlée par l'intermédiaire d'un cycle oxydatif quelconque.

β) L'isocitritase

Cette enzyme, mise en évidence par CAMPHELL et coll. en 1953 (53), a été décelée depuis, dans de nombreux tissus végétaux comme chez des micro-organismes :

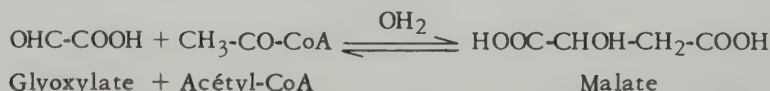


Nous n'avons actuellement que peu d'arguments pour discuter de sa présence ou de son absence dans le latex d'hévéa.

- On peut seulement remarquer que l'isocitrate n'a pas pu être trouvé dans le latex et que le glyoxylate, résultant du fonctionnement de l'iso-citritase, après incorporation d'acétate 2-C^{14} dans le citrate, n'est pas radioactif, ce qui rend plus délicate sa mise en évidence.
- L'acide glyoxylique n'a été, à ce jour, décelé dans le latex, ni sous forme d'acide libre, ni sous forme de 2-4-dinitrophénylhydrazone.
- Après des incubations de citrate 1-5-C^{14} sur dialysat en présence ou non de glyoxylate, nous n'avons pas pu déceler une accumulation de radioactivité dans la 2-4-dinitrophénylhydrazone du glyoxylate.
- Remarquons, néanmoins, que la glycine, pouvant résulter de la transamination de l'acide glyoxylique, est présente en quantité notable dans le latex.

γ) La malate synthétase

Cette enzyme, découverte par WONG et AJL (198), est susceptible, par une réaction d'aldolisation, de condenser le glyoxal sur l'acétate. Cette réaction est assez semblable à la condensation de l'oxaloacétate sur l'acétate pour donner le citrate :



- Afin de mettre en évidence la présence de la malate synthétase, nous avons tenté d'accumuler du malate radioactif après incubation d'acétate 2-C^{14} sur dialysat en présence ou non de glyoxylate, avec et sans compétition isotopique au niveau malate-citrate. (Tableau 69)

Tableau 69 : INFLUENCE DE L'APPORT DE GLYOXYLATE SUR LA RADIOACTIVITE DU MALATE.

Motif	Concentration M/L		Radioactivité du malate en cpm		
	Glyoxylate	Citrate + Malate	Exp. 1 m.v. : B-5	Exp. 2 m.v. : B-7	Exp. 3 m.v. : B-1
T	0	0	25	15	15
1	1.10^{-2}	0	45	30	35
2	0	2.10^{-2}	40	110	45
3	1.10^{-2}	2.10^{-2}	318	165	135
Incubation de $5 \mu\text{Ci}$ d'acétate 2-C^{14} /ml de dialysat (3 heures à 30°C .)					

On constate que, sans compétition isotopique au niveau malate-citrate, le glyoxylate a un effet positif sur la synthèse du malate radioactif. Cet effet est sensiblement plus intense lorsque le malate marqué est accumulé par compétition isotopique.

- Nous avons réalisé une autre expérimentation sur le même principe, mais sur un dialysat à pH 4, en présence de malonate à la concentration de 1.10^{-2}M , pour bloquer la SDH et sans compétition isotopique (Tableau 70).

Tableau 70 : INFLUENCE DE L'APPORT DE GLYOXYLATE SUR LA RADIOACTIVITE DU MALATE EN PRESENCE DE MALONATE à pH 4.

MOTIF	Radioactivité du malate en cpm			
	Exp. 1 m.v. : B-3	Exp. 2 m.v. : B-1	Exp. 3 m.v. : B-5	Exp. 4 m.v. : B-3
MALONATE $1.10^{-2}M$	140	55	235	50
MALONATE $1.10^{-2}M$ + GLYOXYLATE $5.10^{-2}M$	290	255	840	70
Incubation de 5 μCi d'acétate $2-C^{14}$ /ml de dialysat (3 heures à 30° C.)				

Il apparaît, là encore, que l'apport de glyoxylate a entraîné une synthèse très nettement plus intense du malate radioactif.

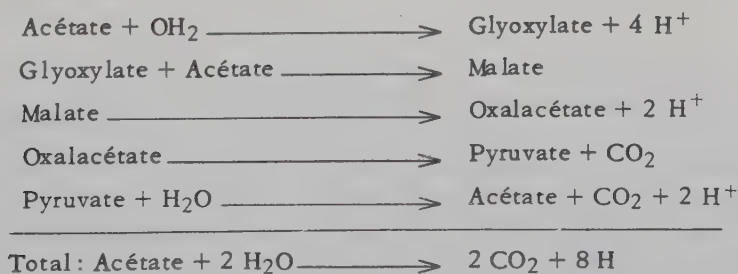
δ) Discussion

Le fonctionnement de l'isocitritase s'avère, dans nos conditions, des plus problématiques, tandis que l'activité de la malate synthétase semble beaucoup plus vraisemblable. En effet, l'isocitritase est dépendante de l'aconitase or nous avons vu précédemment, tant par compétition isotopique que par l'inhibition au fluoracétate, que l'oxydation de l'acétate n'était pas systématiquement liée au fonctionnement intégral du cycle de Krebs. Toutefois, il semble qu'on soit en droit d'expliquer par la malate synthétase l'oxydation supplémentaire rencontrée, dans un certain nombre de cas, de l'acétate par apport de glyoxylate.

e) Oxydation de l'acétate via le glycolate

La possibilité d'une oxydation directe de l'acétate en CO_2 via le glycolate, le glyoxylate et le formiate a été signalée par BOLCATO et all. (46) (47) chez la levure et E. COLI.

Pour sa part, MOSE et coll. (120) ont mis en évidence l'oxydation de l'acétate en glycolate, chez CHLORELLA PYRENOIDOSA. L'existence d'une possibilité d'oxydation directe de l'acétate en glycolate et glyoxylate a amené UTTER (182) à proposer un nouveau cycle oxydatif de l'acétate dont le schéma serait le suivant :



L'existence d'un tel cycle est évidemment hypothétique ; on remarquera qu'il ne constitue qu'un développement du cycle glyoxylique. Nous ne discuterons ici que la possibilité d'une oxydation directe de l'acétate en glycolate et de l'oxydation de ce glycolate en glyoxylate, formiate et CO_2 .

α) Oxydation directe de l'acétate en glycolate

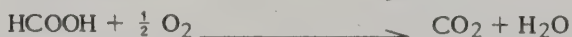
Les incubations d'acétate 2-C^{14} , sur dialysat et surtout sur latex, permettent assez souvent l'obtention de glycolate radioactif. Il est cependant bien évident que, procédant ainsi, on ne peut avoir aucune idée de la façon dont il est synthétisé.

Si le glycolate est impliqué dans une chaîne oxydative quelconque partant de l'acétate, on peut penser qu'il sera susceptible d'être accumulé par compétition isotopique et que l'apport d'une quantité importante de glycolate réduira le rendement de l'oxydation de l'acétate. Toutefois plusieurs séries d'incubations d'acétate 2-C^{14} en présence d'une concentration croissante de glycolate n'ont permis de déceler ni un effet dépressif sur l'oxydation de l'acétate en C^{14}O_2 , ni une accumulation de glycolate marqué sur les chromatogrames.

On peut penser, qu'en l'occurrence, la transformation directe de l'acétate en glycolate n'est pas la voie normale d'oxydation.

β) Oxydation du glycolate en CO_2

La chaîne permettant l'oxydation complète du glycolate en CO_2 est bien connue ; on admet couramment les réactions suivantes :



Nous avons cherché à vérifier le fonctionnement de ces réactions au sein des dialysats ; pour ce faire, nous avons tout d'abord déterminé dans quelle mesure le glycolate et le formiate marqués étaient oxydés en C^{14}O_2 , puis nous avons ensuite tenté de déceler les intermédiaires de la chaîne réactionnelle.

Des incubations comparées de glycolate 2-C^{14} et d'acétate 2-C^{14} sur un dialysat et des mesures de la radioactivité du C^{14}O_2 produit nous ont montré qu'un tel milieu était parfaitement apte à oxyder le glycolate et que cette oxydation s'effectuait avec un meilleur rendement que pour l'acétate 2-C^{14} (Tableau 71).

Tableau 71 : RENDEMENT DE L'OXYDATION DE L'ACETATE ET DU GLYCOLATE 2-C^{14} SUR DIALYSAT.

Promoteur	Rendement de l'oxydation en C^{14}O_2 (%)			
	Exp. 1 m.v. : P-1	Exp. 2 m.v. : W-1	Exp. 3 m.v. : B-1	Moyenne
Acétate 2-C^{14}	3,0	1,0	6,4	3,5
Glycolate 2-C^{14}	7,8	2,8	26,2	12,3
Incubation de $5 \mu\text{Ci}$ d'acétate 2-C^{14} et de glycolate 2-C^{14} de même activité spécifique par ml de dialysat (3 heures à 30°C .)				

Dans les mêmes conditions, nous avons constaté que le formiate C^{14} était de même susceptible d'être oxydé en CO_2 sur dialysat, mais aussi sur latex. Dans les 2 cas, le rendement de l'oxydation du formiate est supérieur à celui de l'oxydation de l'acétate (Tableau 72).

Tableau 72 : OXYDATION DU FORMIATE C^{14} EN $C^{14}O_2$ SUR DIALYSAT.

Promoteur	Rendement de l'oxydation en $C^{14}O_2$ (%)	
	Sur latex	Sur dialysat
Acétate $2-C^{14}$	1,5	0,9
Formiate C^{14}	17	28

Afin de déceler le glyoxylate résultant de l'oxydation du glycolate, nous avons incubé sur dialysat du glycolate $2-C^{14}$ en présence ou non de glyoxylate. Après incubation, les 2-4-dinitrophénylhydrazones des acides aldéhydiques et cétoniques ont été préparées, puis séparées par chromatographie sur papier. Il est apparu que, en présence de glyoxylate non marqué agissant comme piège, une radioactivité apparaissait dans le spot correspondant à la 2-4-dinitrophénylhydrazone du glyoxylate. On peut donc en conclure que le glycolate est effectivement susceptible d'être oxydé en glyoxylate, dans nos conditions opératoires.

Nous avons ensuite cherché à montrer que le formiate est intermédiaire dans l'oxydation du glycolate en CO_2 . Pour ce faire, nous avons tenu compte des travaux de TAKAMIA (168), selon qui l'hypophosphite est un inhibiteur spécifique de la déshydrogénase formique. Ce fait a été vérifié en incubant du formiate C^{14} dans un dialysat, en présence d'un taux croissant d'hypophosphite, et en mesurant la radioactivité du $C^{14}O_2$ produit (Tableau 73).

Tableau 73 : INHIBITION PAR L'HYPOPHOSPHITE DE L'OXYDATION DU FORMIATE C^{14} EN $C^{14}O_2$.

HYPOPHOSPHITE Concentration M/L	Rdt oxydation Formiate* en $C^{14}O_2$ (en %)
0	58
1.10^{-3}	11
$2,5.10^{-3}$	4,7
5.10^{-3}	2,4
Incubation de 5 μCi de formiate C^{14} par ml de dialysat (3 heures à 30°C.) m.v. : B-3	

Il apparaît, en effet, qu'à la concentration annoncée par TAKAMIA ($2,5.10^{-3} M$) (168), l'hypophosphite est remarquablement efficace pour inhiber l'oxydation du formiate. Cette propriété de l'hypophosphite a été mise à profit, d'une part, pour montrer qu'il est susceptible de réduire le rendement de l'oxydation du glycolate en CO_2 et, d'autre part, pour mettre en évidence le formiate marqué résultant de l'oxydation partielle du glycolate.

Nous avons donc tout d'abord incubé sur dialysat du glycolate $2-C^{14}$, en présence ou non d'une concentration de $2,5.10^{-3} M$ en hypophosphite. Il apparaît effectivement une inhibition très nette de l'oxydation du glycolate en $C^{14}O_2$ en présence d'hypophosphite, puisque le rendement passe de 13 à 1,8, de 39 à 14, et de 13 à 5,9 %, dans 3 expériences réalisées sur 3 latex différents.

Par ailleurs, après une incubation de glycolate 2-C^{14} , en présence ou non d'hypophosphite, les acides volatils ont été extraits du milieu par entraînement à la vapeur, neutralisés, concentrés à sec et séparés sur colonne de silice (Fig. 29).

Alors que, sans hypophosphite, nous n'avons pu déceler aucune radioactivité dans le formiate, plus de 10.000 cpm ont été comptés après incubation en présence d'hypophosphite.

On est donc en droit d'affirmer que le glycolate est susceptible d'être oxydé au sein des dialysats par l'intermédiaire du glyoxylate et du formiate.

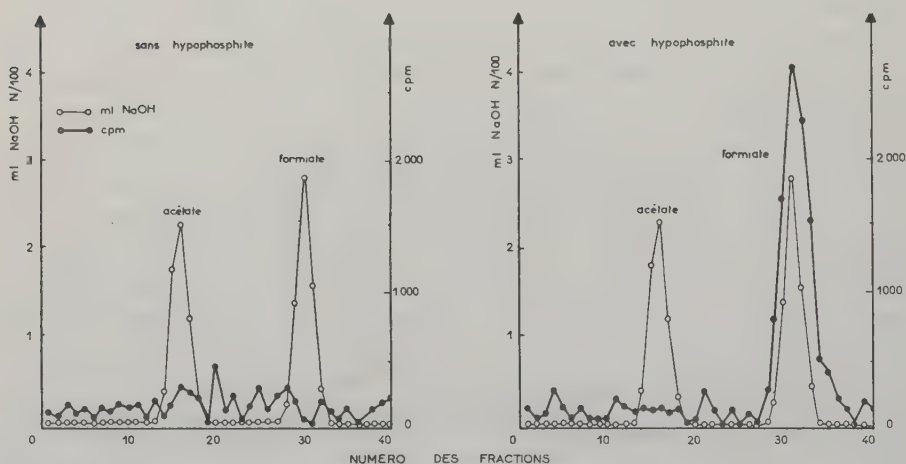


Figure 31 : FORMATION DE FORMIATE* PAR OXYDATION DE GLYCOLATE 2-C^{14} EN PRESENCE OU NON D'HYPOPHOSPHITE

Séparation sur colonne de silice : Acidité et radioactivité des fractions

γ) Discussion

Cette expérimentation n'est pas en faveur d'une oxydation directe de l'acétate en glycolate; toutefois il a pu être montré clairement que le glycolate est susceptible d'être totalement oxydé dans nos conditions.

f) Discussion

Nous venons de voir que toutes les enzymes nécessaires au fonctionnement du cycle de Krebs sont présentes au sein du latex; de plus, l'oxydation du citrate 1-5-C^{14} montre bien qu'elles peuvent effectivement y fonctionner. Nous avons, par ailleurs, de très bonnes raisons de croire que toutes les conditions sont réunies pour que le cycle des diacides puisse également y être effectif. Il semble, par contre, peu vraisemblable que le shunt glyoxylique fonctionne dans son intégrité. On ne peut cependant rejeter la possibilité que du glyoxylate, provenant d'une autre source que de la scission de

l'isocitrate, puisse se condenser sur l'acétate pour conduire au malate et concourir ainsi à l'oxydation de l'acétate. L'oxydation directe de l'acétate en CO_2 via le glycolate, telle qu'elle a été mise en évidence par ailleurs, paraît très improbable bien que l'oxydation du glycolate en CO_2 soit effective dans nos conditions.

Nous nous trouvons donc en présence de plusieurs possibilités dont nous discuterons maintenant en tenant compte des résultats antérieurs.

3 - Considérations d'ensemble

Ce sont les expériences utilisant la compétition isotopique au niveau du citrate qui, les premières, nous ont amenés à nous poser la question de savoir si le classique cycle de Krebs constituait la voie normale d'oxydation de l'acétate dans les dialysats de latex. L'attention fut dès lors attirée par le succinate. L'inhibition malonique a mis clairement en évidence le rôle prépondérant de la SDH dans l'oxydation de l'acétate, tandis que l'inhibition par le fluoracétate nous a amenés à concevoir l'existence d'un mécanisme "shunt" susceptible de se substituer au cycle de Krebs lorsque ce dernier était bloqué par le fluoracétate. Cette expérimentation nous a conduits à penser que l'acétate pouvait être introduit dans un cycle oxydatif ne faisant pas obligatoirement intervenir l'enzyme de condensation et nous nous sommes orientés vers le cycle des diacides. Nous venons de voir que les enzymes nécessaires au fonctionnement de ce cycle et du cycle de Krebs existent et fonctionnent dans les dialysats. On peut se demander lequel de ces 2 cycles joue un rôle prépondérant ?

Dès que l'incubation est effectuée en présence d'une dose élevée de citrate, ou de fluoracétate à pH 7, il est logique de croire que la grande majorité de l'acétate marqué introduit est oxydée via le cycle des diacides. Le problème est alors de savoir si ce cycle est effectivement un mécanisme shunt intervenant lorsque le cycle de Krebs est bloqué, ou s'il joue de toute façon un rôle propre. Il est à ce propos intéressant de remarquer que, si l'inhibition par le fluoracétate constitue réellement un blocage au niveau de l'aconitase, la compétition isotopique par le citrate n'est pas réellement une inhibition de la desmolyse, mais masque tout au plus celle-ci vis-à-vis de notre méthode de mesure (oxydation d'une petite quantité d'acétate 2-C^{14} en C^{14}O_2). Or, en fait, aux doses où le succinate est efficace, nous n'avons constaté qu'une réduction faible ou nulle de l'oxydation de l'acétate en CO_2 par l'apport de citrate. Ceci doit être considéré en faveur du fonctionnement normal du cycle des diacides, au moins sur dialysat et en partant d'acétate 2-C^{14} comme substrat.

Si cette argumentation nous conduit à penser que le cycle des diacides peut être la voie normale et non un mécanisme shunt, il importe de faire des restrictions concernant nos conditions opératoires.

Il se peut en effet que, sur les dialysats, l'introduction de l'acétate soit plus aisée dans le succinate que dans le citrate ce qui favoriserait

d'autant le cycle des diacides au détriment du cycle de Krebs, lequel pourrait donc être la voie normale sur latex. La dialyse est en effet parfaitement susceptible de modifier considérablement les conditions de fonctionnement des divers systèmes enzymatiques. A ce propos, nous avons toutefois constaté que l'apport des cofacteurs les plus classiques (ATP, DPNH, CoA, Glutathion) n'avait pas d'effet sur le rendement de l'oxydation de l'acétate 2-C^{14} par des dialysats.

Le tableau 57 de la page a montré que le citrate 1-5-C^{14} pouvait être oxydé avec un meilleur rendement que l'acétate. Ceci pourrait à priori infirmer nos conclusions antérieures quant au rôle "naturel" du cycle des diacides. Toutefois, notre précédente remarque impliquant une activation relative sur dialysat de l'enzyme synthétisant le succinate à partir de 2 acétyl-CoA par rapport à l'enzyme de condensation, peut expliquer cette apparente contradiction. Par ailleurs, nous devons préciser que, lors d'incubations de citrate 1-5-C^{14} sur latex, nous avons constaté une incorporation de la radioactivité dans le HMG., le malate et le caoutchouc (Tableau 74 et figure 31).

Incubation de $2,5 \mu\text{Ci}$ de citrate 1-5-C^{14} /ml de latex, 3 heures à 30°C .

On notera la radioactivité introduite dans le malate, le HMG et le pyrrolidone-carboxylate (artefact du glutamate)

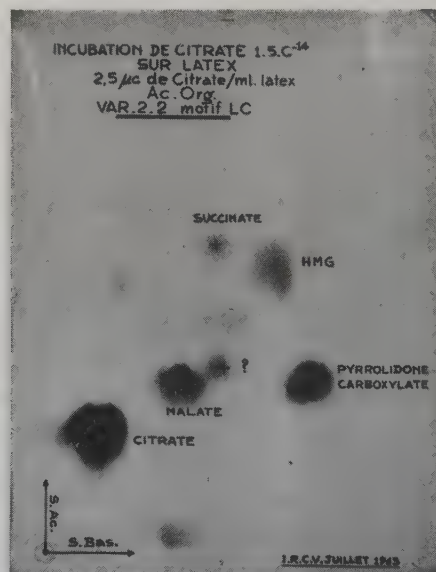


Figure 32 : ACIDES ORGANIQUES RESULTANT DE L'INCUBATION DE CITRATE- 1-5-C^{14} SUR LATEX.

La façon la plus simple d'expliquer ces résultats est d'admettre qu'une partie du citrate 1-5-C^{14} a été clivée par la réaction inverse de sa formation en acétate 1 et en oxalacétate 4-C^{14} ; l'acétate étant alors susceptible d'être repris pour la synthèse du caoutchouc ou par le cycle des diacides, tandis que l'oxalacétate 4-C^{14} conduirait au malate marqué.

Tableau 74 : INCORPORATION COMPAREE DE LA RADIOACTIVITE DE L'ACETATE 2-C¹⁴ ET DU CITRATE 1-5-C¹⁴ DANS LE CAOUTCHOUC ET DANS LE HMG, APRES INCUBATION SUR LATEX.

Expérience	Rdt incorporation dans le Cc (%)		Radioactivité dans le HMG (cpm)	
	ACETATE	CITRATE	ACETATE	CITRATE
1 m.v. : P-1	6,4	0,1	65	1.250
2 m.v. : B-4	6,4	2,2	5	235
3 m.v. : P-1	8,9	2,4	20	605
Incubation d'acétate 2-C ¹⁴ et de citrate 1-5-C ¹⁴ ; 2,5 μ Ci par ml de latex (3 heures à 30° C.)				

Cette dernière expérimentation met parfaitement en lumière la complexité des réactions sur dialysats.



On est donc en droit d'admettre que la majorité de l'acétate introduit sur dialysat doit logiquement être oxydée via le cycle des diacides, tandis qu'il n'en est vraisemblablement pas de même lorsqu'un autre substrat, tel le citrate, est utilisé par le milieu enzymatique qu'est le dialysat.

Si, comme nous l'avons vu, l'oxydation directe de l'acétate en CO₂ via le glycolate peut être exclue, il faut cependant considérer que la malate-synthétase peut également intervenir dans l'oxydation de l'acétate. On voit donc apparaître l'existence, au sein des dialysats, de divers mécanismes plus ou moins interconnectés, et susceptibles de se substituer en partie ou totalement l'un à l'autre, suivant les conditions du moment. Ce n'est sans doute pas l'un des aspects les moins importants de la variabilité propre au latex dont nous avons fait largement état précédemment.

Nous ne pouvons que faire des hypothèses sur ce qui se passe effectivement, au sein du latex, pour l'oxydation finale des produits de la glycolyse. Nous rappellerons avoir signalé précédemment que, dans des incubations d'acétate sur latex, il est apparu, dans 1/3 des cas, une radioactivité plus grande dans le succinate que dans le citrate. Ce fait nous a alors amenés à considérer la possibilité d'une synthèse directe du succinate. On est donc en droit de considérer, également sur latex, la réalité du fonctionnement de l'enzyme de la condensation de THUNBERG-KNOOP et du cycle des diacides.

E - DISCUSSION

Nous avons pu constater qu'il était particulièrement difficile, pour plusieurs raisons, de mettre en évidence un métabolisme respiratoire au sein

du latex. Le découplage entre l'absorption d'oxygène et le dégagement de CO_2 est quasi systématique et, d'autre part, l'apport de substrat n'a pratiquement aucun effet sur ces critères. Il a fallu avoir recours à de très faibles doses de promoteur marqué pour déceler, sur latex, une activité desmolytique et des oxydations respiratoires des plus réduites. Dans ces conditions, il était évidemment très difficile de chercher à définir ces phénomènes. Il est heureusement apparu que, sur dialysat, la desmolyse était de 10 à 20 fois supérieure à celle mise en évidence sur latex, bien qu'encore très faible en valeur absolue. Cependant, là encore, nous n'avons pas pu utiliser les méthodes classiques et nous avons dû employer l'oxydation de promoteurs marqués en C^{14}O_2 pour pouvoir tenter de définir cette respiration.

L'emploi des inhibiteurs usuels des chaînes respiratoires s'est avéré dans l'ensemble assez décevant. En effet, si le cyanure, l'oxyde de carbone, le DIECA et l'o.phénantroline sont réellement susceptibles d'inhiber, à des degrés divers, l'oxydation de l'acétate, nous n'avons pu cependant déceler la nature de la chaîne des oxydases terminales, car des contradictions, au moins apparentes, se sont fait jour entre les diverses expériences. On peut penser toutefois qu'il existe plusieurs possibilités au niveau de ces oxydases et que telle chaîne est plus active que telle autre en fonction des conditions prévalant au sein du latex utilisé. Déterminer exactement la nature de ces mécanismes aurait nécessité une étude beaucoup plus approfondie, qu'il ne nous a pas été possible d'entreprendre dans le cadre de ce travail.

Nous avons pu déceler, sur dialysat, la présence de 2 cycles oxydatifs distincts : le cycle de Krebs et le cycle des diacides. Il semble que l'on puisse affirmer que ces 2 mécanismes oxydatifs coexistent. Cependant l'oxydation de l'acétate par un dialysat passerait davantage par la condensation de THUNBERG-KNOOP que par le cycle de Krebs, tandis que ce serait l'inverse pour le citrate.

Il ne faut pas perdre de vue que la desmolyse que nous avons pu ainsi déceler est d'une très faible intensité. Elle correspond, sur dialysat, à l'oxydation de 0,01 micromol. d'acétate* par ml de dialysat et par heure. Tandis que nous avons pu constater sur latex, dans les mêmes conditions, l'utilisation de 5 micromol. de glucose par ml et par heure. On est en droit de penser que le pyruvate et l'acétate résultant de la glycolyse sont plus utilisés pour des synthèses, telles que celles du caoutchouc, des acides organiques, des lipides et des protéines, que pour produire de l'énergie en étant totalement oxydés en CO_2 . Nous avons constaté lors de l'étude de l'oxydation de l'acétate sur dialysat, combien celle-ci était sensible à l'action du gaz carbonique (p. 75). Il est permis de penser que c'est, en fait, cette sensibilité au CO_2 qui conditionne la faible I.R. sur dialysat et surtout sur latex. La transformation du pyruvate en acétate, comme la biogenèse du caoutchouc à partir de ce dernier, libèrent les quantités très élevées de CO_2 qu'a pu mettre en évidence Van den TEMPEL (174). On est en droit de penser que c'est le taux de ce gaz carbonique qui est susceptible de limiter à des valeurs très faibles le métabolisme respiratoire du latex.

Ces diverses considérations impliquent à priori qu'il peut ne pas exister de liaison étroite entre la biogenèse du caoutchouc et les phénomènes respiratoires.

Le problème de l'apport d'énergie indispensable à la biosynthèse du caoutchouc se pose alors immédiatement. Nous avons vu, lors de l'étude des inhibiteurs de la respiration, que CNH possédait une action dépressive nette sur le rendement de la biosynthèse du caoutchouc alors que l'action du DIECA et celle de l'o.phénantroline sont beaucoup plus faibles et nettement plus sujettes à variations. L'action de ces inhibiteurs pourrait néanmoins impliquer une liaison entre la respiration et la synthèse du caoutchouc. Il est toutefois parfaitement impossible d'acquérir une certitude absolue dans ce domaine tant que les groupes métalliques des enzymes commandant la chaîne des transformations de l'acétate en caoutchouc ne sont pas parfaitement connus. On se heurte de nouveau au manque de spécificité des inhibiteurs. Nous avons montré également que le 2-4-DNP possédait une action tant sur le rendement de la biosynthèse du caoutchouc que sur le renouvellement du P.e.I. On pourrait, là encore, conclure à priori à une liaison entre la respiration et cette synthèse. Remarquons toutefois que l'inhibition de la synthèse du caoutchouc par le 2-4-DNP n'est pas toujours complète; ceci peut être attribué à la phosphorylation liée au substrat laquelle n'est pas affectée par le 2-4-DNP.

Il est important de souligner maintenant que, dans l'ensemble des phénomènes respiratoires, il est fondamental de distinguer entre l'oxydation complète de l'acétate, que l'on a tout lieu de croire relativement réduite, et les phénomènes oxydatifs liés à la dégradation du glucose par la voie des hexoses ou par celle des pentoses. On peut normalement envisager, étant donné l'intensité du fonctionnement des mécanismes entraînant la dégradation du glucose dans le latex, que ceux-ci sont parfaitement suffisants pour fournir la majorité, sinon la totalité, de l'énergie nécessaire à la vie de la cellule laticifère. Nous ne prétendons pas cependant que la phosphorylation oxydative liée à l'oxydation de l'acétate est totalement découplée de la biogenèse du caoutchouc et ce, d'autant plus qu'elle est considérablement plus énergétique que celle liée à la voie des hexoses, mais sensiblement équivalente à celle provenant de la voie des pentoses phosphates. Il se peut au contraire que, malgré la faible intensité de l'oxydation de l'acétate, celle-ci intervienne, au moins dans certains cas, de façon sensible dans l'apport d'énergie. Il semble toutefois que, d'une façon générale, la biogenèse du caoutchouc soit plus dépendante sur le plan énergétique de la dégradation du glucose que de celle de l'acétate.



III - LES REACTIONS DE CARBOXYLATION

A - GENERALITES

L'intense dégagement de gaz carbonique du latex "in vitro", mis initialement en évidence par Van den TEMPEL (174), conduit à penser que la pression partielle de CO₂ régnant au sein des laticifères est extrêmement favorable aux réactions de carboxylation.

Nous venons de voir que le CO₂ du latex pouvait raisonnablement être impliqué en tant que cause de la faible I.R. du latex. Les réactions de carboxylation peuvent logiquement être considérées comme un moyen qu'a le latex de réduire le taux de CO₂ en l'utilisant à des synthèses diverses. Quelques expériences préliminaires ayant effectivement montré une intensité non négligeable des réactions de carboxylation, nous avons entrepris de les définir afin de pouvoir déterminer, par la suite, l'existence de liaisons éventuelles entre ces réactions et la productivité.

Nous nous attacherons plus particulièrement, dans les paragraphes qui suivent, à la mise en évidence de 2 réactions carboxylantes: celle transformant le pyruvate en oxalacétate et celle liée à la synthèse de l'acide malonique.

B - CARBOXYLATION DU PYRUVATE

1 - Introduction

La fixation de CO₂ à l'obscurité, par un certain nombre de plantes, est connue depuis longtemps (176) (121) (197). Il en ressort, qu'à l'obscurité, les carboxylations peuvent l'emporter sur les oxydations, ce qui se traduit par une augmentation de l'acidité due à l'accumulation de certains acides organiques, essentiellement les acides oxalacétique, malique et citrique.

Plusieurs systèmes enzymatiques susceptibles d'expliquer ces synthèses ont été proposés, ils reposent tous sur la réaction de WOOD-WERKMANN, c'est-à-dire sur la bêta-carboxylation du pyruvate citons :

- La phospho-énol-pyruvate (P.E.P.) carboxykinase

Cette enzyme a été décelée dans un certain nombre de milieux.



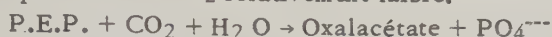
Elle nécessite la présence d'ADP et est catalysée par les ions Mn⁺⁺. C'est une réaction équilibrée. La synthèse de l'oxalacétate nécessite une pression partielle de CO₂ relativement élevée, sinon, l'enzyme favorise la décarboxylation de l'oxalacétate.

- L'enzyme malique

Découverte par OCHOA (131), elle permet la synthèse directe de l'acide malique; elle est réversible et nécessite la présence de TPN⁺.

- La P.E.P. carboxylase

Elle a été mise en évidence par BANDURSKI et GREINER (32): la réaction qu'elle commande est pratiquement irréversible et ne nécessite qu'une pression partielle de CO_2 relativement faible.



Les ions Mg^{++} ou Mn^{++} sont indispensables à son fonctionnement. Elle peut être associée à la déshydrogénase malique.

2 - Incubations de C^{14}O_2

Des incubations de C^{14}O_2 ont été effectuées sur latex, dans des conditions très variées. Il est apparu une activité plus ou moins intense, mais systématique, dans les spots correspondant aux acides malique et citrique; parmi les acides aminés, seul l'acide aspartique est radioactif (Fig. 32).

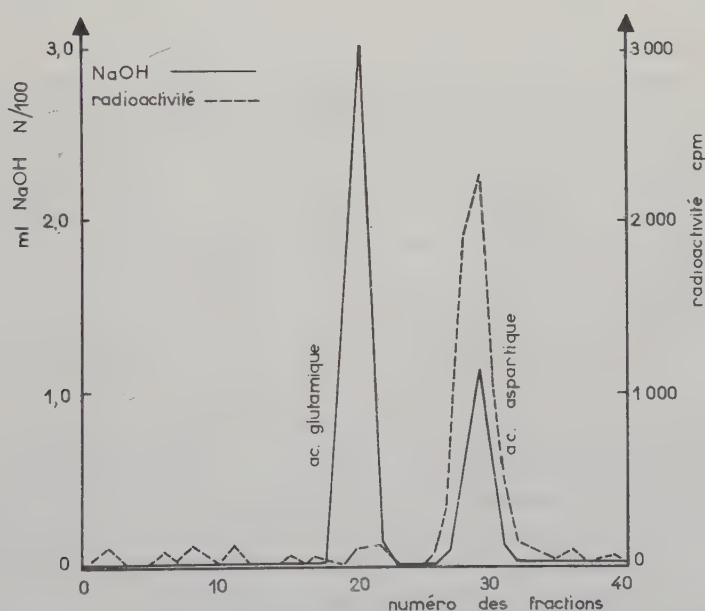


Figure 33: FORMATION D'ASPARTATE MARQUE PAR INCUBATION DE C^{14}O_2

Acidité et radioactivité des fractions

Les incubations ont été effectuées, soit directement dans des tubes contenant 10 microcuries de $\text{C}^{14}\text{O}_3\text{HNa}$ par ml de latex, soit en atmosphère de C^{14}O_2 (10 microcuries) avec ou sans CO_2 entraîneur et avec ou sans dégazage sous vide du latex. Dans tous les cas, la présence d'acides malique et citrique radioactifs a été constatée.

3 - Incubation de pyruvate 1 ou 3-C¹⁴

Du pyruvate de sodium 1-C¹⁴ ou 3-C¹⁴ a été également incubé sur divers latex.

- L'examen des radiochromatogrammes montre le plus souvent la présence des acides citrique et malique, assez faiblement marqués, à côté d'un certain nombre d'acides non-identifiés, (*) en général plus radioactifs.
- Nous avons constaté, cependant, que la radioactivité introduite dans les acides citrique et malique est plus intense en partant de pyruvate 1-C¹⁴ que de pyruvate 3-C¹⁴, incubé à même activité spécifique, sur un même latex.
- Dans une autre expérience, nous avons incubé du pyruvate 1-C¹⁴ sur latex, au Warburg, en présence d'un taux croissant de thiamine (Vitamine B-2). Le diphosphate de thiamine (DPT) est la co-carboxylase, co-facteur de la décarboxylation oxydative du pyruvate. Le rendement de la décarboxylation du pyruvate 1-C¹⁴ a été mesuré par détermination de la radioactivité du CO₂ dégagé (Tableau 75).

Tableau 75: INFLUENCE DE LA THIAMINE SUR LA
DECARBOXYLATION DU PYRUVATE 1-C¹⁴

THIAMINE microg./ ml	Rdt décarboxylation Pyruvate 1-C ¹⁴ - m. v.: P-3
0	1 %
25	20
50	22
250	69
Incubation 10 μ Ci Pyruvate 1-C ¹⁴ / ml latex	

Il apparaît effectivement que la thiamine favorise la décarboxylation du pyruvate; il est, cependant, curieux de constater, à l'examen des chromatogrammes, que la thiamine a pour effet d'augmenter considérablement la synthèse du citrate et du malate radioactifs. Tout se passe comme si c'était le C¹⁴O₂, provenant de la décarboxylation du pyruvate 1-C¹⁴ qui servait à la synthèse de ces 2 acides et non le pyruvate 1-C¹⁴ lui-même.

4 - Discussion

Il apparaît donc effectivement qu'au sein du latex, le pyruvate est susceptible de se carboxyler. Avant de discuter de l'importance de cette carboxylation, nous remarquerons qu'il est vraisemblable que le P.E.P. plutôt que le pyruvate lui-même, soit le substrat de ces carboxylations. Nous avons vu en effet que le pyruvate 1-C¹⁴, dont on sait la facilité à se décarboxyler, conduit à un marquage plus intensif du citrate et du malate que le pyruvate 3-C¹⁴.

On est en droit de penser que les réactions de bêta - carboxylation du P.E.P. sont intenses au sein du latex. Il ne faut, en effet, pas perdre

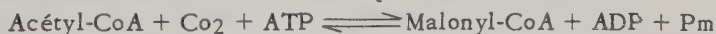
(*) Il est apparu que dans la plupart des cas des acides inconnus étaient des artefacts provenant de la décomposition du pyruvate marqué.

de vue que l'activité spécifique du $C^{14}O_2$ introduit devient très faible au sein du latex par suite du CO_2 présent naturellement ou se dégageant lors de l'incubation. Tandis que pour les incubations d'acétate marqué sur latex, la dilution par l'acétate présent n'est que de 1 à 2, on a tout lieu de croire que, de même que pour les incubations de glucose marqué, la dilution du $C^{14}O_2$ est de l'ordre de 1 à 1000. Une telle dilution implique donc une activité intense de la réaction de bêta-carboxylation du P.E.P. et on est ainsi amené à croire que les quantités élevées de citrate et de malate présentes dans le latex proviennent davantage de l'oxalacétate résultant de cette carboxylation que du fonctionnement normal du cycle de Krebs.

C - SYNTHESE DE L'ACIDE MALONIQUE

I - Introduction

L'acide malonique, dont on sait le rôle fondamental dans la synthèse des acides gras, résulte le plus souvent de la bêta-carboxylation de l'acétyl-CoA, selon une réaction mise en évidence par WAKIL (186).



Avant de discuter de la réalité de cette réaction dans nos conditions opératoires, nous indiquerons la raison qui nous a fait accorder une attention particulière à l'acide malonique. En effet dès les premières incubations d'acétate $2-C^{14}$ dans des latex divers, il est apparu que la radioactivité d'un acide baptisé N, à l'époque, était systématiquement en relation inverse avec la radioactivité incorporée dans le caoutchouc (65) (Fig. 33).

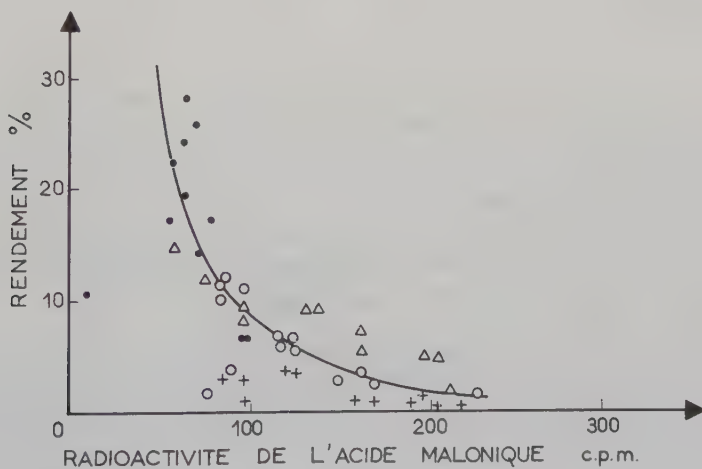
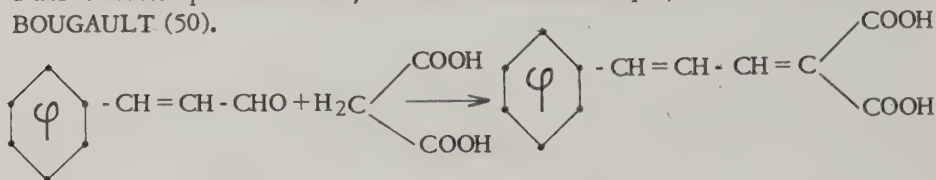


Figure 34: RELATION ENTRE LA RADIOACTIVITE DE L'ACIDE MALONIQUE (Spot N) ET LE RENDEMENT DE L'INCORPORATION DE L'ACETATE $2-C^{14}$ DANS LE CAOUTCHOUC

2 - Mise en évidence de l'acide malonique

En collaboration avec S. PUJARNISCLE, nous avons déterminé la nature de l'acide correspondant au spot "N" par chromatographie bidimensionnelle et par séparation sur colonne de silice et sur colonne de Dowex;

dans tous les cas, il présentait les propriétés de l'acide malonique. Une certaine quantité de cet acide radioactif a été récupérée, après plusieurs incubations d'acétate 2-C¹⁴, séparée et purifiée par chromatographie sur colonne de silice et de Dowex 2, puis finalement transformée, en présence d'acide malonique entraîneur, en acide cinnamalonique, selon la méthode de BOUGAULT (50).



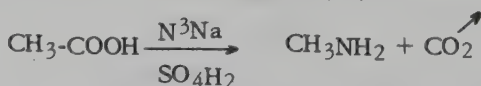
Après séparation et recristallisation dans un mélange éthanol-eau, nous avons mesuré la radioactivité du produit de la réaction au compteur à flux de gaz comparativement à celle du mélange d'acide malonique marqué et non marqué, l'activité spécifique de l'acide cinnamalonique (15,000 cpm/mmol.) étant en bon accord avec celle de l'acide malonique initial (14.350), nous en avons conclu que le spot "N" des premières radiochromatographies correspondait réellement à l'acide malonique.

Par ailleurs, une certaine quantité d'acide malonique radioactif, provenant d'incubation d'acétate 2-C¹⁴, a été séparée et purifiée comme précédemment, puis dégradée, carbone par carbone, afin de connaître la radioactivité de ceux-ci. Pour réaliser cette dégradation, nous avons mis à profit la propriété qu'à l'acide malonique de se décarboxyler en acide acétique et en CO₂, lorsqu'il est porté à une température légèrement supérieure à son point de fusion (152).



Dans ces conditions l'acide acétique distille et est recueilli dans la neige carbonique, tandis que le CO₂ est ensuite fixé dans un barboteur à NaOH. Le CO₃Na₂ est alors transformé en CO₃Ba et sa radioactivité déterminée de la façon habituelle.

L'acide acétique recueilli est neutralisé par NaOH, puis l'acétate est évaporé à sec dans une étuve à vide, et dégradé en méthylamine et CO₂ par N₃Na + SO₄H₂, selon la réaction de SCHMIDT (55).



A la fin de la réaction, le CO₂ est fixé par injection de NaOH dans le ballon.

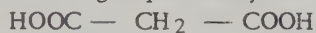
La méthylamine est extraite du milieu réactionnel par distillation, récupérée dans SO₄H₂ titré en excès, dosé et finalement oxydé en CO₂ par MnO₄K (73).

Par ailleurs, une partie aliquote d'acide malonique a été dégradée totalement en C¹⁴O₂, par le persulfate (132)(Tableau 76).

Tableau 76: DEGRADATION DU MALONATE RADIOACTIF
CARBONE PAR CARBONE

HOOC 	Activité spécifique (cpm/mg)	19
CH ₂ 	Activité totale (cpm)	756
COOH	Activité spécifique	1,178
	Activité totale	68,943
	Activité spécifique	14
	Activité totale	737
	Total cpm	70.436
HOOC 	Dégradation totale	
CH ₂ 	Activité totale (cpm)	71,545
HOOC		

Il ressort de cette dégradation que toute la radioactivité est pratiquement concentrée dans le groupe méthylène de l'acide malonique.



1,11 % 97,87 % 1,08 %

Ceci est parfaitement compatible avec l'hypothèse selon laquelle l'acide malonique résulterait de la bêta-carboxylation de l'acétate, selon WAKIL (186).

3 - Considérations sur la synthèse de l'acide malonique

L'expérimentation utilisée pour montrer que la synthèse de l'acide malonique se faisait effectivement par carboxylation de l'acétate selon la réaction de WAKIL a consisté, tout d'abord, à incuber dans des conditions diverses $\text{C}^{14}\text{O}_3\text{HNa}$ ou C^{14}O_2 , au sein du latex complet, d'un sérum ou d'un culot, espérant ainsi mettre en évidence la réaction :



Malgré un nombre élevé d'incubations sur des latex divers et avec des méthodes différentes, il ne nous a jamais été possible de déceler une radioactivité significative à l'emplacement de l'acide malonique sur les radiochromatogrammes.

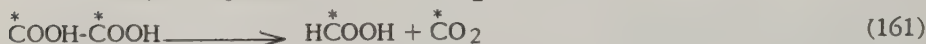
A ce type d'expérimentation, on peut faire l'objection que, contrairement à la bêta-carboxylation du pyruvate qu'il est aisé de réaliser avec du C^{14}O_2 exogène, il est possible que la synthèse de l'acide malonique ait lieu dans des particules que le C^{14}O_2 exogène ne puisse pas pénétrer,

par suite de la barrière maintenue par le CO_2 endogène autour de ces particules. Ceci nous a amenés à incuber un certain nombre de composés organiques susceptibles de libérer du C^{14}O_2 au sein du latex. Dans le même temps, nous avons utilisé plusieurs composés susceptibles de libérer un groupe formyle actif, afin de tenir compte d'une réaction suggérée par VAGELOS (183) qui pourrait être réversible.

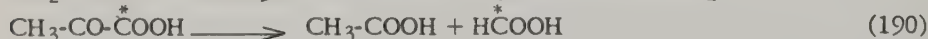
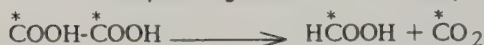


L'ensemble des mécanismes suivants a donc été considéré :

- Composés générateurs de C^{14}O_2 endogène



- Composés générateurs de formyle actif



L'oxalate 1-2- C^{14} , le pyruvate 1- C^{14} , le glycolate 1 ou 2- C^{14} et le formiate C^{14} ont été incubés dans des latex complets, des sérums ou des culots dialysés ou non, sans qu'il ait été possible de mettre en évidence une radioactivité significative dans le malonate.

Cette expérimentation réduit notablement les raisons que l'on a de croire que l'acide malonique résulte de la carboxylation de l'acétate selon WAKIL (186) ou de la fixation d'un composé en C-1 sur ce même acétate. On ne peut, cependant, rejeter totalement l'hypothèse selon laquelle le CO_2 venant se fixer sur le malonate proviendrait du groupe carboxyle d'un composé bien défini qui n'a pas été considéré ici, par exemple le carbone 6 du citrate (1).

Si l'on considère d'autres possibilités qu'une réaction du type Wakil pour la synthèse du malonate, la voie la plus connue est celle mise en évidence par VENNESLAND (184) et qui implique la décarboxylation de l'oxalacétate. Cette voie doit être écartée dans nos conditions, car la bêta-carboxylation du pyruvate dont on a démontré la réalité au sein du latex doit, à partir de C^{14}O_2 , conduire à de l'oxalacétate-4- C^{14} et delà, par la voie de VENNESLAND, au malonate-1-3- C^{14} . Or, rappelons-le, nous n'avons jamais pu déceler la radioactivité significative dans le malonate après incubation de C^{14}O_2 .

Nous devons toutefois signaler que, lors d'incubations de malate-3- C^{14} sur latex ou sur dialysats, nous avons pu incidemment déceler une radioactivité très nette dans le malonate (figure 34).

Dans des expériences antérieures, il est de même apparu dans plusieurs circonstances une certaine radioactivité dans le malonate après incubation de succinate-2-3- C^{14} .

De plus, il semble que FOURNIER et coll. (67) aient pu dans quelques cas particuliers mettre en évidence une certaine radioactivité dans la malonate après incubation d'une quantité de $C^{14}O_2$ aussi élevée que 50 μCi par ml de milieu.

A l'encontre des raisons que l'on a de penser que l'acide malonique résulte d'une réaction simple, il faut, cependant, noter le fait que les 2 carbones de l'acétate ne jouent pas le même rôle vis-à-vis de la synthèse de l'acide malonique. En effet, des incubations, à activité spécifique égale, d'acétate 1 et $2-C^{14}$ ont été réalisées sur des latex différents et il est apparu que l'acétate $2-C^{14}$ conduisait à un acide malonique systématiquement plus radioactif que l'acétate $1-C^{14}$ (Tableau 77).

Tableau 77: RADIOACTIVITE DU MALONATE RESULTANT D'INCUBATION D'ACETATE 1 ET $2-C^{14}$

MOTIF	Radioactivité de l'acide malonique en cpm			Rapport des radio-activité: $2-C^{14}$ / $1-C^{14}$		
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3
Acétate $2-C^{14}$	275	170	90	4,2	2,3	1,4
Acétate $1-C^{14}$	65	70	65			
+ 5.10-3M Malonate						
Acétate $2-C^{14}$	355	310	335	3,1	5,0	4,5
Acétate $1-C^{14}$	115	60	75			
m.v. :	P-2	W-1	B-3			
Incubation de 5 microcuries d'acétate 1 et $2-C^{14}$ /ml de latex (3 heures à 30° C.)						

4 - Aperçu sur le métabolisme de l'acide malonique

Si la voie de synthèse de l'acide malonique reste donc, en fait, purement hypothétique, on a, par contre, pu acquérir un certain nombre d'indications sur son métabolisme.

Il est notamment apparu que l'acide malonique était un des premiers acides organiques synthétisés dans le latex à partir d'acétate $2-C^{14}$ et que sa radioactivité avait tendance à décroître ou à rester constante, en fonction du temps d'incubation, comme ceci est illustré dans la figure 35.

Par ailleurs, nous avons constaté que l'acide malonique était (avec l'acide β -hydroxy- β -méthyl-glutarique (HMG)) l'un des seuls acides qu'il était possible d'accumuler, sur latex, de façon quasi systématique, par compétition isotopique (Tableau 78).

Tableau 78: ACCUMULATION DE L'ACIDE MALONIQUE PAR COMPETITION ISOTOPIQUE APRES INCUBATION D'ACETATE $2-C^{14}$ SUR LATEX

MOTIF	Radioact. de l'ac. malonique en cpm			
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4
TEMOIN	80	75	30	140
+ 5.10-3M MALONATE	215	325	260	300

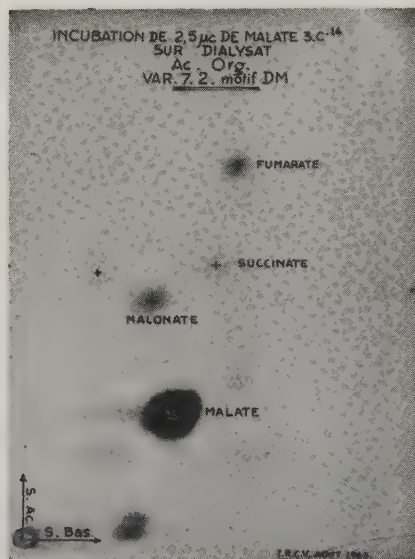


Figure 35: RADIOACTIVITE INCORPORE DANS LE MALONATE APRES INCUBATION DE MALATE 3-C¹⁴

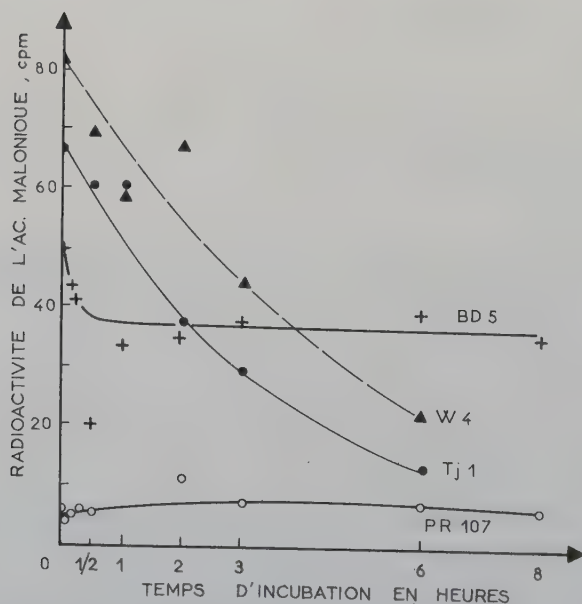


Figure 36: RADIOACTIVITE DE L'ACIDE MALONIQUE EN FONCTION DU TEMPS D'INCUBATION D'ACETATE 2-C¹⁴ SUR LATEX

Ces 2 expériences peuvent s'interpréter si l'on admet que l'acide malonique possède, au sein du latex, un métabolisme propre et n'est pas un produit qui s'accumule naturellement.

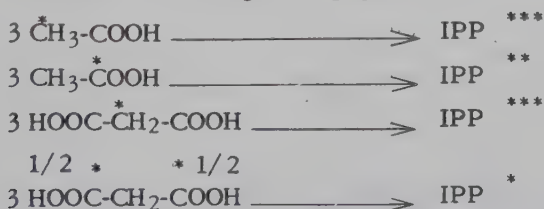
Des incubations d'acétate 2-C^{14} et de malonate 2-C^{14} effectuées sur un même latex (les promoteurs étant ramenés à la même activité spécifique) ont montré que le malonate était susceptible de conduire au caoutchouc marqué, avec, toutefois, un rendement 10 à 20 fois plus faible que celui obtenu avec l'acétate 2-C^{14} (Tableau 79).

Tableau 79: RENDEMENT COMPARE DE LA TRANSFORMATION DE L'ACETATE 2-C^{14} ET DU MALONATE 2-C^{14} EN CAOUTCHOUC RADIOACTIF

Expérience	Rdt de la transformation en Cc* (en %)	
	ACETATE 2-C^{14}	MALONATE 2-C^{14}
1 m.v. BD. 5	8,8	0,6
2 m.v. PR. 107	14,6	0,8
3 m.v. BD. 5	6,2	0,5
Incubation de $5\text{ }\mu\text{Ci}$ de promoteur/ml de latex, (3 heures à 30°C.)		

Il apparaît donc que l'acide malonique est susceptible d'être métabolisé, au sein du latex, pour conduire au caoutchouc. Nous n'avons pas, en l'occurrence, porté attention à un métabolisme possible de l'acide malonique vers les acides gras; on sait, en effet, depuis WAKIL, que l'acide malonique est un intermédiaire de la synthèse des acides gras, à partir de l'acétyl-CoA, par voie non-mitochondriale (187). Nous nous sommes contentés d'étudier sommairement le métabolisme de l'acide malonique vers le caoutchouc. Il a été fait état, dans de nombreux travaux, de ce que l'acide malonique est susceptible d'être métabolisé de diverses façons et notamment d'être oxydé via le cycle de Krebs. Il est admis que la première étape de l'utilisation de l'acide malonique est sa décarboxylation en acide acétique. Il en résulterait donc que le malonate marqué serait transformé en acétate avant d'être utilisé dans la synthèse du caoutchouc.

On peut vérifier, au moins en partie, cette hypothèse en utilisant le fait que les 2 carbones de l'acétate ne jouent pas le même rôle dans la synthèse de la molécule d'IPP: (figure 6, page 25)



Le rapport 3/2 de l'activité du caoutchouc résultant d'incubations d'acétate 2 et 1-C^{14} a été vérifié par RABINOWITZ et TEAS (145). Des incubations de malonate 2 et 1-C^{14} nous ont permis de constater, de même, que le rendement de la biosynthèse, à partir de malonate 2 et 1-C^{14} , était bien dans le rapport de 3 (Tableau 80).

Tableau 80: TRANSFORMATION COMPAREE DE MALONATE 2 ET 1-C¹⁴ EN CAOUTCHOUC RADIOACTIF

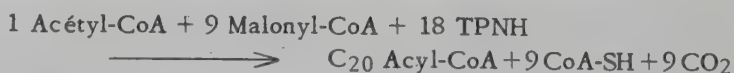
Expérience	Rendement de la biosynthèse		Rapport des rendements
	MALONATE 2-C ¹⁴	MALONATE 1-C ¹⁴	
1 m.v.: W-1	0,3 %	0,1 %	3,0
2 m.v.: P-6	0,7	0,2	3,5
3 m.v.: B-3	1,2	0,4	3,0
Incubation de 5 μ Ci de malonate 1 et 2-C ¹⁴ par ml de latex (3 heures à 30° C.)			

Il n'est donc pas invraisemblable que la transformation du malonate en polyisoprène ait, pour première étape, la décarboxylation de caoutchouc malonate en acétate. On ne peut, cependant, négliger les travaux récents de BRODIE, WASSON et PORTER (51), selon lesquels, dans le foie de pigeon, l'acide malonique serait un intermédiaire dans la synthèse du MVA. Une étude pour confirmer l'existence d'un tel mécanisme au sein du latex est en dehors de notre programme et n'a pas été entreprise.

5 - Discussion

Tant que le mécanisme de la synthèse de l'acide malonique dans le latex n'a pu être mis clairement en évidence, nous ne pouvons rejeter l'hypothèse selon laquelle il résulterait d'une carboxylation. Il faut toutefois garder présent à l'esprit que toutes les expériences, présentées ici, ne sont pas en faveur d'une telle hypothèse.

Afin d'expliquer la relation inverse dont il a été question plus haut entre la synthèse du malonate marqué et du caoutchouc radioactif à partir d'acétate 2-C¹⁴, la première hypothèse fit état d'une inhibition malonique du cycle de Krebs. On dut revenir rapidement sur cette hypothèse tant par suite de la faible concentration de malonate au sein du latex ($<1.10^{-4}$ M) qu'à cause d'une faible activité du cycle de Krebs. Les récents travaux de RIBAILLIER, TUONG CHI CUONG et FOURNIER (148) (67) ont permis d'avancer une hypothèse satisfaisante. Ces auteurs ont tout d'abord mis en évidence l'importance de la disponibilité en TPN⁺ réduit pour la biosynthèse du caoutchouc. Ils vérifièrent également l'importance de ce même TPN⁺ réduit pour la synthèse des acides gras au sein du latex, par la voie classique suivante:



Dès lors il était logique de penser que l'accumulation d'acide malonique, conjointement à une biogenèse réduite du caoutchouc, était due à une déficience du milieu en TPNH.

D - DISCUSSION - CONCLUSION

Si l'on excepte la synthèse de l'acide malonique, dont il n'est pas encore démontré parfaitement qu'elle résulte d'une carboxylation, le rôle des réactions de carboxylation dans le métabolisme du latex et plus particulièrement vis-à-vis de la biogenèse du caoutchouc n'apparaît pas clairement.

La teneur élevée en CO_2 du latex à la sortie de l'arbre peut, certes, expliquer l'intensité relativement élevée de ces réactions et la synthèse des acides citrique et malique à partir du pyruvate peut logiquement être considérée comme une voie de désengorgement pour une faible partie du CO_2 libéré lors de la synthèse du caoutchouc. On a également tout lieu de penser que le CO_2 ainsi libéré n'est pas sans modifier quelque peu le pH du latex. Or, il a été montré précédemment que les variations du pH ont un effet marqué sur la biosynthèse du caoutchouc; l'hypothèse selon laquelle le CO_2 interviendrait dans la régulation de la synthèse du caoutchouc, de même qu'il interviendrait dans l'oxydation de l'acétate, doit donc être sérieusement envisagée.

Les relations entre les carboxylations et la biogenèse du caoutchouc ont toutefois été abordées par FOURNIER et coll. (67). Ces auteurs utilisèrent l'avidine, inhibiteur classique des réactions de carboxylation. Ils purent mettre en évidence qu'un taux optimum d'avidine, variable selon les latex, possédait une action positive sur le rendement de la biosynthèse à partir d'acétate 2-C^{14} . Quelques expériences utilisèrent également la biotine, cofacteur des carboxylations. L'ensemble de ces expériences ne semble pas avoir permis aux auteurs de tirer des conclusions parfaitement claires.

On doit donc admettre que, si l'intensité de ces réactions est apparue très nettement, leur rôle dans le métabolisme général ne peut faire l'objet que d'hypothèses de travail.



DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSIONS

Bien que très incomplète, l'étude que nous avons entreprise permet cependant d'attribuer une importance particulière à certains des mécanismes métaboliques qui ont fait l'objet de notre travail et c'est ce point qu'il nous faut maintenant examiner, après avoir résumé brièvement l'ensemble des résultats obtenus.

Les quantités relativement importantes d'oses et de monosaccharides présentes dans le latex sont, comme l'on pouvait s'y attendre, le matériel de base de toutes les synthèses, en même temps que la source première d'énergie. "In vitro", bien que le latex ne soit plus alimenté, le glucose est effectivement dégradé de façon intensive, comme nous avons pu le constater de diverses façons. Il est de plus apparu une liaison directe entre la dégradation des glucides, la disponibilité en liaisons phosphorylées énergétiques et la biogenèse du caoutchouc à partir d'acétate marqué "in vitro". Cependant, l'accumulation de 3-PGA que nous avons mise en évidence sous l'influence de FNa ne nous permet pas de préjuger de l'origine de la 3-P-Glycéraldéhyde et donc du schéma effectivement impliqué dans la dégradation du glucose. Des travaux récents, signalés précédemment, ont en effet montré, par l'analyse de $C^{14}O_2$ libéré du glucose 1 ou 6- C^{14} , la réalité, au moins dans certains cas, de la voie des pentoses. De plus, d'autres travaux ont reconnu la nécessité indispensable, sur des latex étudiés en Europe, de la régénération du TPN⁺ par les premières étapes de la voie des pentoses phosphates (146).

Le pyruvate, résultant de la glycolyse, s'avère, dans la cellule laticifère, être effectivement situé au carrefour de toutes les synthèses, en effet :

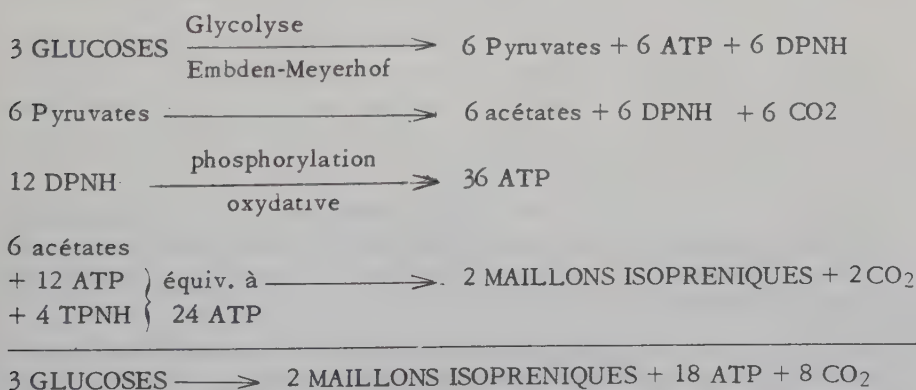
- 1 - Sa décarboxylation conduit à l'acétate, matière première de la biogenèse du caoutchouc, en outre, nous avons pu vérifier que cet acétate intervient, logiquement, dans la synthèse de certains acides organiques, notamment du citrate, du succinate et du malonate. Toutefois, nous avons vu pour quelles raisons on peut croire que l'oxydation de l'acétate par le cycle de Krebs ou par le cycle des diacides est de faible intensité dans le latex "in vitro". On pourrait donc penser que l'utilisation primordiale de l'acétate au sein de la cellule laticifère est en fait la biosynthèse du caoutchouc.
- 2 - La carboxylation du pyruvate en oxalacétate est apparue intense et elle est très vraisemblablement à la base de la synthèse des quantités élevées de citrate et de malate présentes dans le latex. Néanmoins, les relations entre ces carboxylations et la biogenèse du caoutchouc ne sont pas encore éclaircies à ce jour.
- 3 - Le pyruvate, l'oxalacétate et l' α -cétoglutarate conduisent par des réactions de transamination aux 3 acides aminés quantitativement les plus

importants du latex: l'alanine, l'aspartate et le glutamate. Rappelons cependant que ce dernier peut provenir de la voie plus récente mise en évidence par LOSADA (111). Quoi qu'il en soit, la synthèse des acides aminés sous-entend l'existence de la protéinogenèse; existence très vraisemblable si l'on se souvient des travaux de Mac MULLEN (124) (127) qui ont permis de mettre en évidence les acides ribonucléiques du latex.

Si l'on tient compte de la lipogenèse que nous n'avons pas envisagée personnellement mais qui a été mise en évidence par ailleurs (68), il apparaît que le latex et, à fortiori, la cellule laticifère dans son intégrité sont parfaitement aptes à assurer les synthèses vitales de la cellule en plus de la biogenèse du caoutchouc.

Parmi les points insuffisamment éclaircis, figure en premier lieu tout ce qui a trait au métabolisme respiratoire du latex. Nous avons formulé précédemment l'hypothèse que l'intensité réduite de ce métabolisme au sein du latex pouvait être consécutive à la teneur élevée de ce dernier en CO_2 . On ne saurait en effet l'imputer à l'absence des enzymes responsables puisque nous avons pu, au cours de ce travail, déceler de façon plus ou moins directe le fonctionnement de toutes les enzymes du cycle de Krebs et, semble-t-il, du cycle des diacides. Il faut donc admettre, soit que la respiration du latex "in vitro" est masquée ou inhibée, soit qu'elle fonctionne avec une intensité réduite et préférentiellement pour la synthèse des métabolites intermédiaires plutôt que pour l'apport d'énergie.

Si l'on considère maintenant le métabolisme sous l'angle purement énergétique. Il faut noter que les revues bibliographiques ayant trait à la biogenèse du caoutchouc (65) (191) admettent qu'il faudrait l'équivalent de 9 ATP pour synthétiser un maillon isoprénique: sachant que la glycolyse produit 2 pyruvates, 2 ATP et 2 DPNH et que l'on obtient ainsi finalement en aérobiose 2 acétates et l'équivalent de 12 ATP, on peut écrire les réactions schématiques suivantes:



De telles réactions globales sont naturellement très théoriques. Si l'inhibition par le 2-4 DNP du taux de liaisons phosphorylées énergétiques disponibles (et de la biosynthèse du caoutchouc) est en faveur d'une certaine phosphorylation oxydative, on ne peut cependant savoir dans quelle mesure elle intervient dans la régénération de l'ATP à partir des cofacteurs réduits.

De plus, l'origine du TPNH n'est pas explicité, soit qu'il provienne de l'action d'une transdeshydrogénase sur le DPNH, soit du fonctionnement de la voie des pentoses.

Il ressort donc, qu'au moins théoriquement, l'énergie libérée par la glycolyse est suffisante pour assurer la synthèse du cis-polyisoprène. Accessoirement, cette équation permet de remarquer que la synthèse de 136 g de caoutchouc entraîne la formation de 8 molécules de CO_2 , soit plus d'une molécule-gramme de CO_2 pour 100 g de latex. On ne saurait trop insister sur l'aspect théorique de ce genre d'équation, aspect rendu plus évident par les travaux d'autres équipes concernant l'existence de la voie des pentoses. Il apparaît que la complexité que nous avons pu entrevoir dans le fonctionnement des divers mécanismes cycliques ou non, liés à l'oxydation de l'acétate, prévaut donc également au niveau des systèmes liés à la dégradation du glucose.



Arrivés à ce point, les insuffisances de notre étude apparaissent clairement; afin d'approfondir la connaissance du métabolisme au sein du latex, on peut songer à priori à poursuivre ces travaux dans 4 directions différentes.

- 1 - Il est bien évident que les mécanismes liés à la dégradation des glucides (voie des hexoses et des pentoses) sont, comme on pouvait l'imaginer à priori, de première importance vis-à-vis de la biogenèse du caoutchouc et donc de la productivité de l'hévéa. Il semble primordial d'établir la nature exacte de ces mécanismes et leur activité relative au sein du latex dans les circonstances les plus diverses, comme en fonction de la productivité et des facteurs qui la modifie.
- 2 - Bien que finalement l'oxydation de l'acétate n'apparaisse pas liée étroitement à la biogenèse du caoutchouc, au moins dans le latex "in vitro", il pourrait être utile d'étudier le fonctionnement de la phosphorylation oxydative, les facteurs qui influent sur son rendement ainsi que les réactions d'oxydo-réduction qui l'alimente.
- 3 - De portée pratique, apparemment moins immédiate, il faudrait néanmoins envisager l'étude des réactions de carboxylation dont on ignore, malgré quelques travaux (67), la signification dans le métabolisme général de la cellule laticifère.
- 4 - Notons enfin l'intérêt qu'il y aurait sur le plan plus général de la recherche biochimique à découvrir le mécanisme, apparemment original, qui permet au sein du latex la synthèse du malonate.

On peut donc dessiner à grands traits l'image d'une cellule laticifère tirant l'énergie et la matière première acétate nécessaire à son fonctionnement des systèmes dégradant le glucose. Au moins dans le latex à l'équilibre une pression élevée de CO_2 , consécutive à la synthèse même du caoutchouc,

pourrait être le facteur limitant des systèmes enzymatiques oxydant l'acétate qui, bien que présents, semblent d'une activité limitée. Ceci ne saurait toutefois présager en rien de ce qui se passe réellement au sein des laticifères lorsque, immédiatement après une saignée, ils sont en période d'activité intense. On aperçoit clairement ici les inconvénients qu'il peut y avoir à travailler sur le latex "in vitro"... Quoi qu'il en soit, étant donné la fonction particulière des laticifères qu'est la synthèse du caoutchouc, il paraît satisfaisant pour l'esprit que la masse de la matière première acétate soit davantage utilisée pour la synthèse du caoutchouc et accessoirement des métabolites intermédiaires et des constituants normaux de toute cellule que pour la fourniture d'énergie.



A la fin de ce mémoire, il apparaît que le latex d'Hévéa brasiliensis "in vitro" s'est avéré posséder un échantillonnage remarquable d'activités enzymatiques diverses. S'il a été cependant possible de relier "in vitro" l'activité de certains mécanismes à la biogenèse du caoutchouc, on est maintenant en droit de se demander, si les activités enzymatiques du latex "in vitro" d'une part, reflètent celles du latex "in vivo" et, si d'autre part, elles peuvent être reliées à la biosynthèse du caoutchouc "in vivo", c'est-à-dire en fait la productivité. Utilisant les connaissances acquises ici, nous avons dans un autre mémoire tenté de répondre à ces questions en comparant productivité et activités enzymatiques du latex.

Nous rappellerons en effet en terminant que cette étude s'insère dans le plan de travail des Instituts du caoutchouc visant, par des études biochimiques, à mieux connaître les facteurs liés à la productivité de l'Hévéa brasiliensis dans l'espoir ultérieur d'agir sur tel ou tel d'entre eux dans un sens favorable à la production.



BIBLIOGRAPHIE

- 1 - ABRAHAM S., CHAIKOFF I.L., BORTZ W.M., KLEIN H.P., HALINA DEN, 1961
Particle involvement in fatty acid synthesis in liver and yeast systems (Nature, London, 192, 1287-1288).
- 2 - AJL S.J., KAMEN M.D., 1951
Studies on the mechanism of Acetate oxidation by Escherichia Coli (J. Biol. Chem., 189 (2), 845-857).
- 3 - ALBERT A., GLEDHILL W.S., 1947
The choice of a chelating agent for inactivating trace metabolism. I. A survey of commercially available chelating agents (Biochem. J., 41, 529-533).
- 4 - ALBERT A., MAGRATH D., 1947
The choice of a chelating agent for inactivating trace metabolism. 2. Derivatives of oxine (8-hydroxyquinoline) (Biochem. J., 41, 534-545).
- 5 - ALDOUS J.G., ROZEE K.R., 1956
The effect of pH on the toxicity of Fluoroacetic acid (Biochem. J., 62, 605-610).
- 6 - ALTMAN R.F.A., 1940
Organische analyse Van Hevea-latex. IV. Aminozenen (Archief voor Rubbercult., 24, 647-654).
- 7 - ALTMAN R.F.A., 1941
Organische analyse Van Hevea-latex. VI. Alcoloiden in Whole-latex rubber (Archief voor Rubbercult., 25, 14-17).
- 8 - ALTMAN R.F.A., 1948
Natural vulcanization Accelerators in Hevea-latex (Ind. Eng. Chem., 40, 241-249).
- 9 - ALTMAN R.F.A., 1947
Natural Antioxidants in Hevea-latex (Inst. Rubb. Ind. Trans. and Proceed., 23, 179-192).
- 10 - ANDREWS E.H., DICKENSON P.B., 1960
Preliminary Electron Microscope observations on the Ultra-Structure of the latex vessel and its contents in young tissues of Hevea Brasiliensis (Proceed. Rubb. Res. Conf. Kuala-Lumpur, 756-765).
- 11 - ANDREWS E.H., DICKENSON P.B., 1961
Observations préliminaires au Microscope électronique sur l'Ultra-Structure des vaisseaux laticifères et du latex dans les tissus jeunes de l'Hevea Brasiliensis (Rev. Gén. Caout., 38, 397-402).
- 12 - ARCHER B.L., 1960
The protéins of Hevea Brasiliensis latex (Biochem. J., 75, 236-240).
- 13 - ARCHER B.L., AYREY G., COCKBAIN E.G., SWEENEY G.P. Mac, 1961
Incorporation of (L ¹⁴C) Isopentenyl pyrophosphate into polyisoprene (Nature, London, 189, 663-664).
- 14 - ARCHER B.L., COCKBAIN E.G., 1955
The proteins of Hevea Brasiliensis latex. 2. Isolation of the α globulin of fresh latex serum (Biochem. J., 61, 508-512).

- 15 - ARCHER B.L., MULLEN A.I. Mac, 1960
Some Recent Studies of the non-rubber constituents of Natural Rubber Latex (Proc. Nat. Rubb. Res. Conf., Kuala-Lumpur, 787-795).
- 16 - ARCHER B.L., SEKHAR B.C., 1955
The proteins of Hevea Brasiliensis latex. 1. Proteins constituents of fresh latex serum (Biochem. J., **61**, 503-508).
- 17 - ARREGUIN B., BONNER J., 1950
The biochemistry of rubber formation in the guayule II (Arch. Biochem., **26**, 178-186).
- 18 - ARREGUIN B., BONNER J., WOOD B.J., 1951
Studies on the mechanism of rubber formation in the guayule III. Experiments with isotopic carbon (Arch. Biochem., **31**, 234-247).
- 19 - ASHWELL G., 1957
Colorimetric Analysis of Sugars: Methods in Enzymology, (COLOWICK S.P., KAPLAN N.O., vol. III, 73-105, Acad. Press N.Y.)
- 20 - d'AUZAC J.
Résultats non publiés.
- 21 - d'AUZAC J., NGUYEN-HUNG-CHAT, PUJARNISCLE S., 1960
Sur quelques facteurs du développement microbien au sein du latex et ses conséquences (Rev. Gén. Caout., **37**, 61-68).
- 22 - d'AUZAC J., PUJARNISCLE S., 1960
Sur la signification du rapport Mg/P des latex vis-à-vis de leur stabilité (Inst. Rech. Caout. Vietnam, Op. Tech. 40/60).
- 23 - d'AUZAC J., 1964
Disponibilité en phosphore énergétique, biosynthèse du caoutchouc et productivité de l'Hevea brasiliensis (C.R. Acad. Sci. Paris, **258**, 5091-5094)
- 24 - d'AUZAC J., PUJARNISCLE S., 1961
Méthodes d'analyses organiques utilisées à l'I.R.C.V. (Inst. Rech. Caout. Vietnam: Op. Techn. 51/61)
- 25 - d'AUZAC J., PUJARNISCLE S., 1962
Etude des variations saisonnières de quelques composants du latex (Inst. Rech. Caout. Vietnam: Rapp. Interne biochimie 1962/3, non diffusé).
- 26 - d'AUZAC J., PUJARNISCLE S., 1959
Sur les différentes formes de phosphore présentes dans le latex d'hévéa (Rev. Gén. Caout., **36**, 862-870).
- 27 - d'AUZAC J., PUJARNISCLE S., 1959
Les glucides de l'Hévéa Brasiliensis - Etude qualitative (Rev. Gén. Caout., **36**, 1687-1692).
- 28 - d'AUZAC J., PUJARNISCLE S., 1961
Aperçu sur l'étude des glucides de l'hévéa et sur leur variation (Rev. Gén. Caout., **38**, 1131-1139).
- 29 - d'AUZAC J., PUJARNISCLE S., 1963
Sur quelques relations entre l'activité enzymatique du latex et la production en caoutchouc de l'Hévéa Brasiliensis (C.R. Acad. Sci., **257**, 299-301).
- 30 - d'AUZAC J., PUJARNISCLE S., 1964
Sur quelques éléments en faveur de la réaction de THUNBERG-KNOOP et du cycle des diacides au sein du latex d'Hevea Brasiliensis (C.R. Acad. Sci. **258**, 3929-3931)

- 31 - d'AUZAC J., PUJARNISCLE S., FOURNIER P., TUONG CHI CUONG., 1962
Contribution à l'étude des métabolismes en relation avec la Biosynthèse du caoutchouc au sein de l'Hevea Brasiliensis, Part I (Annales de la Faculté des Sciences Saïgon, 97-120).
- 32 - BANDURSKI R.S., GREINER C.M., 1953
The enzymatic synthesis of Oxalacetate from Phosphoryl-enol-pyruvate and carbon dioxide (J. Biol. Chem., 204, 781-786).
- 33 - BANDURSKI R.S., TEAS H.J., 1957
Rubber biosynthesis in latex of Hevea Brasiliensis (Plant Physiol., 32, 643-648).
- 34 - BARNARD J.D., 1963
(Nat. Rubb. Produc. Res. Assoc., Communication privée)
- 35 - BARNES I.C., Mac MULLEN A.I., Mac DONNEL J., 1962
Hormone influence on the thiol content of Hevea brasiliensis latex (Nature, London, 194, 1083-1084)
- 36 - BARRON E.S.G., ARDAO M.I., HEARON M., 1950
The mechanism of Acetate oxidation by corynebacterium creatinovorans (Arch. Biochem., 29, 130-153).
- 37 - BEAUFILS E.R., 1961
Les déséquilibres dans la composition chimique de l'hévéa. La méthode du "diagnostic physiologique" (Thèse d'ingénieur-docteur n° 700, Paris)
- 38 - BEAUFILS E.R., 1954
Contribution to the study of mineral elements in field latex (Proceed. Third Rubb. Tech. Conf. Londres, 87-98).
- 39 - BEEVERS H., 1952
Malonic acid as an inhibitor of maize root respiration (Plant Physiol., 27, 725-735).
- 40 - BEREMBLUM J., CHAIN E., 1938
Biochem. J., 32, 286).
- 41 - BISHOP B.O., 1927
Studies on hevea latex. The proteins in serum from Frozen latex (Malaya Agric. J., 15, 27).
- 42 - BLACK S., HUTCHENS J.O., 1948
The oxidation of Acetate by yeast in the presence of Fluoracetate (Arch. Biochem., 17 (2), 211-223).
- 43 - BOATMAN Dr
(Rubb. Res. Inst. Malaya, Communication privée)
- 44 - BOBILIOFF W., 1923
(Anat. and Physiol. of Hevea Brasiliensis Zurich Art. Inst. Orell Füssli Par 1, 150).
- 45 - BOCQUET M., 1946
Possibilité d'amélioration de la production et de la qualité du caoutchouc brut (Cahiers Inst. Rech. Caout. Indochine, 2, 1-21).
- 46 - BOLCATO V., BERNARD B. de, LEGGIERO G., 1957
(Arch. Biochem. Biophys., 69, 372-377).
- 47 - BOLCATO V., BOSCHETTI E., MONTAYA E., 1959
(Anatomie Van Lécunwenhoek, 25, 179).

- 48 - BOLLE-JONES E.W., 1954
Nutrition of *Hévéa Brasiliensis* (J. Rubb. Res. Inst. Malaya, **14**, 183, 209, 231).
- 49 - BONNER J., ARREGUIN B., 1949
The Biochemistry of the Rubber formation in the Guayule 1 (Arch. Biochem., **21**, 109-124).
- 50 - BOUGAULT, 1913
(J. Pharm. Chem., **8**, 289).
- 51 - BRODIE J.D., WASSON G.W., PORTER I.W.,
A new intermediate in the formation of mevalonic acid
- 52 - BULEN W.A., WARNER J.E., BURREL R.C., 1952
Separation of organic acids from plant tissues, chromatographic technique (Anal. Chem., **24**, 187-190).
- 53 - CAMPBELL J.J.R., SMITH R.A., EAGLES B.A., 1953
A deviation from the conventional tricarboxylic acid in *Pseudomonas Aeruginosa* (Biochem. and Biophys. Acta, **11**, 594).
- 54 - COCKBAIN E.G., SOUTHRN W.A., 1962
Structure et Composition du latex d'hévéa (Rev. Gén. Caout., **39**, 1149-1155).
- 55 - COLOWICK S.P., KAPLAN N.O., 1957
(Methods in Enzymology, vol. IV, p. 553, 719, Acad. Press N.Y.)
- 56 - COOK A.S., SECKAR B.C., 1955
Fractions from *Hevea Brasiliensis* latex Centrifuged at 59,000 g (J. Rubb. Res. Inst. Malaya, **14**, 163-167).
- 57 - COWIE D.B., BOLTON E.T., SANDS M.J., 1950
Sulfur metabolism in *Escherichia Coli*. I. Sulfate metabolism of normal and mutant cells (J. Bacteriol., **60**, 233-248).
- 58 - CRANE R.K., LIPMANN F., 1953
The effect of Arsenate on Aerobic Phosphorylation (J. Biol., **201**, 235-243).
- 59 - DAGLEY S., DAWES E.A., MORRISON G.A., 1951
The dicarboxylic acid "cycle" in bacteriol. metabolism. (Arch. Biochem. and Biophys., **32** (1), 231-232).
- 60 - DRAKE G.V., 1951
The amino acid constituents of the Protein of hevea latex (J. Rub. Res. Inst. Malaya, **13**, 145).
- 61 - DREW F.D., MARSHALL L.M., FRIEDBERG F., 1952
Separation of Keto-acids by cellulose columns (J. Amer. Chem. Soc., **74**, 1852-1853).
- 62 - DWYER F.B., NYHOLM R., 1946
(Proceed. Roy. Soc. N.S. Wales, **80**, 28).
- 63 - FARREN E.F. Mac, 1951
Buffered filter paper chromatography of the amino acids (Anal. Chem., **23**, 168-174).
- 64 - FOLKERS K., SHUNK C.H., LINN B.O., ROBINSON F.M., WITTEICH P.E., HUFF J.W., GILFILLAN J.L., SKEGGS H.R., 1959
Symposium of Biosynthesis of terpenes and sterols (Ciba foundation, J. et A. CHURCHILL Ltd, London).

- 65 - FOURNIER P., d'AUZAC J., PUJARNISCLE S., TUONG-CHI-CUONG, 1961
Relation entre la transformation d'acétate de sodium ^{214}C en cis-polyisoprène et la présence d'acide malonique (C.R. Acad. Sci., 252, 796-798 - Rev. Gén. Caout., 38, 403-404)
- 66 - FOURNIER P., TUONG-CHI-CUONG, 1961
The Biosynthesis of rubber (Rubber Reviews, 1230-1303).
- 67 - FOURNIER P., RIBAILLIER D., TUONG CHI CUONG
(Inst. Fran. Caout., résultats non publiés)
- 68 - FOURNIER P.,
(Inst. Fran. Caout., résultats non publiés)
- 69 - FREEBAIRN H.T., REMMERTT L.F., 1957
(Physiol. Plantarum, 10, 20-28).
- 70 - FREY-WISSLING A., 1929
Microscopisch onderzoek naar het voorkomen van harsen in latex van hevea (Archief voor Rubbercult., 13, 394-434).
- 71 - FRIEDEMANN T.H.E., 1956
Determination of alpha-Keto acids (Method in Enzymology COLOWICK S.P. et KAPLAN N.O., Acad. Press Vol. III, 414-418).
- 72 - GASCOIGNE J.A., OVEREND W.C., MOIR G.F.J., HUBCHER G., 1958
Coenzyme A and aldolase in rubber bearing plants (Nature, London, 181, 628-629).
- 73 - GREENBERG D.M., ROTHSTEIN M., 1957
Methods for chemical synthesis. Isolation and degradation of labelled compounds as applied in metabolic studies of amino acids and proteins (Method in Enzymology, COLOWICK S.P. and KAPLAN N.O., Acad. Press vol. IV, 652-731, N.Y.).
- 74 - HAAN-HOMANS L.N.S. de, 1950
Oxidation Processes in latex of Hevea Brasiliensis (Inst. Rubb. Ind. Trans. and Proceed., 25, 346-363).
- 75 - HAAN-HOMANS L.N.S. de, VAN GILS G.E., 1948
Fresh hevea latex. A complex colloidal system (Proceed. Secon. Rubb. Techn. Conf. Londres, 292-302).
- 76 - HACKETT D.P., 1960
Respiration inhibitors (Encyclopedia of Plant Physiology XII/2, 29-41. Springer Verlag Edit. Berlin).
- 77 - HANES C.S., ISHERWOOD F.A., 1949
Separation of phosphoric esters on filter paper chromatograms (Nature, London, 164, 1107-1112).
- 78 - HILL R., HARTREE E.F., 1953
Hematin compounds in plants (Ann. Rev. Plant Physiol., 4, 115-150).
- 79 - HORECKER B.L., STANNARD J.N., 1948
The cytochrome C-azide complex (J. Biol. Chem., 172, 589-597).
- 80 - HSIA R.C.H., 1958
Oxygen absorption by Hevea Brasiliensis latex (Inst. Rubb. Ind. Trans. and Proceed., 34, 267-290).
- 81 - HURET M., 1948
L'ultracentrifugation du latex d'hévéa (Rev. Gén. Caout., 25, 124-129).

- 82 - INST. RECH. CAOUT. VIETNAM, 1958 - Rapp. Annuel
(Recherche de production)
- Influence de la hauteur d'encoche sur la composition minérale du latex,
p. 32.
- 83 - id - Influence de la profondeur de la saignée sur la composition organique
du latex, p. 58-59.
- 84 - id - Influence de la stimulation hormonale ou par SO_4Cu sur le taux de glucides
du latex, p. 59-60.
- 85 - id - Influence de la stimulation hormonale ou par SO_4Cu sur l'infection du
latex, p. 72-75.
- 86 - id - Variabilité de la production sur plusieurs blocs de greffés, p. 138-143.
- 87 - INST. RECH. CAOUT. VIETNAM, 1956-1958 Rapp. Annuel
(Recherche de Consommation) Acides aminés libres du latex p. 8-11.
- 88 - INST. RECH. CAOUT. VIETNAM, 1959 Rapp. Annuel
(Recherche de production)
- Analyse des acides organiques fixes du latex, p. 49-50, 58-59.
- 89 - id - Acides aminés libres du latex, p. 51-52.
- 90 - id - Influence de la stimulation hormonale ou par SO_4Cu sur le taux d'acides
aminés du latex, p. 53.
- 91 - id - Composition minérale du feuillage et du latex sur des arbres hauts et bas
producteurs d'une même parcelle, p. 28-35.
- 92 - INST. RECH. CAOUT. VIETNAM, 1958-1960, Rapp. Annuel
(Recherche de consommation). Acides aminés libres du latex, p. 8-10.
- 93 - INST. RECH. CAOUT. VIETNAM, 1960-1961-1962, Rapp. Annuels
- Variation des acides organiques du latex sous l'influence de la saison,
p. 21.
- 94 - id - Variation de la composition organique du latex sous l'influence de la
hauteur d'encoche, p. 21-22.
- 95 - id - Composition organique de latex en fonction du clone, p. 39-40.
- 96 - id - Variation des acides organiques du latex sous l'influence de la stimulation,
p. 53-54.
- 97 - JAMES W.O., 1953
The use of respiration inhibitors (Ann. Rev. Plant Physiol. 4, 59-90).
- 98 - JAMES W.O., 1956
The effect of 2-2'dipyridyl on plant respiration (New Phytologist, 55, 269-279).
- 99 - JOLCHINE G., 1962
Le métabolisme de l'acide acétique dans les feuilles de *Bryophyllum daigremontianum* berger (Bull. Soc. Chim. Biol., 44, 337-364).
- 100 - KARUNAKARAN A., MOIR G.F.J., TATA S.J., 1960
The proteins of hevea latex: Ion exchange chromatography and starch gel
electrophoresis (Proceed. Nat. Res. Conf., Kuala-Lumpur, 798-808).
- 101 - KEILIN D., HARTREE E.F., 1940
Succinic deshydrogenase cytochrom system of cells. Intracellular respiratory
system catalyzing aerobic oxidation of succinic acid (Proc. Roy. Soc.,
London, B129, 277-306).

- 102 - KEKWICK R.G.O., ARCHER B.L., BARNARD D., HIGGINS C.M.C., SWEENEY G.P. Mac, MOORE C.G., 1959
Incorporation of DL (2^{14}C) Mevalonic acid lactone into poly-isoprène (Nature, London, **184**, 268-270).
- 103 - KEMP A.R., STRAITIFF W.G., 1940
Hevea latex. Effect of proteins and electrolytes on colloidal behaviour (J. Phys. Chem., **44**, 788).
- 104 - KORKES V., 1956
Carbohydrate metabolism (Ann. Rev. Biochem., **25**, 685-734).
- 105 - KORNBERG H.L., KREBS H.A., 1958
Synthesis of cell constituents from C_2 units by modified tricarboxylic acid cycle (Nature, London, **179**, 988-990).
- 106 - KORNBERG H.L., MADSEN N.B., 1957
Synthesis of C_4 -dicarboxylic acids from acetate by a "Glyoxylate bypass" of the tricarboxylic acid cycle (Biochem. Biophys. Acta, **24**, 651-653).
- 107 - KREBS H.A., 1954
(Chemical Pathways of metabolism, DM GREEBERG, Edit. Vol.1 109-172, Acad. N.Y.)
- 108 - KUSHNER M., WEINHOUSE S., 1949
(J. Amer. Chem. Soc., **71**, 3358).
- 109 - LEVY A.L., CHUNG D., 1953
Two-dimensional chromatography of amino acids on buffered papers (Anal. Chem., **25**, 396-399).
- 110 - LOHMANN K., MEYERHOF. O., 1934
(Biochem. Z., **273**, 60).
- 111 - LOSADA M., TREBST A.U., OGATA S., ARNON D.I., 1960
Equivalence of light and adenosine triphosphate in bacterial photosynthesis (Nature, London, **186**, 753-760).
- 112 - LOWE J.S., 1960
Substrate for VFA formation in natural rubber latex (Inst. Rubb. Ind. Trans. and Proceed., **36-4**, 202-210 - Proceed. Nat. Rubb. Res. Conf., Kuala-Lumpur, 822-832).
- 113 - LOWE J.S., 1962
Effect of magnesium on latex quality (Inst. Rubb. Ind. Trans. Proceed., **38-5**, T208-T215).
- 114 - LOWE J.S., 1959
Formation of volatil fatty acids in ammonia preserved natural latex concentrate (Inst. Rubb. Ind. Trans. and Proceed., **35-1**, 10-18)
- 115 - LUNDEGARTH H., 1960
The cytochrome-cytochrome oxydase system (Encyclopedia of Plant Physiology XII/1 311-364 Springer-verlag, Berlin).
- 116 - MADGE E.V., COLLIER H.M., PEEL J.D., 1950
Treatment of abnormal clonal latex (Inst. Rubb. Ind. Trans. and Proceed., **26**, 305-312).
- 117 - MOIR G.F.S., 1959
Ultracentrifugation and Staining of Hevea latex (Nature, London, **184**, 1626-1628).

- 118 - MOIR G.F.S., TATA S.J., 1960
Proteins of *Hevea Brasiliensis* (J. Rubb. Res. Inst. Malaya, 16, 155-165).
- 119 - MOORE S., STEIN W.H., 1949
Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids (J. Biol. Chem., 176, 367-388).
- 120 - MOSES V., HOLM-HANSEN O., BASSHAM J.A., CALVIN M., 1959
(J. Mol. Biol., 1, 21).
- 121 - MOYSES A., 1957
Les caractéristiques du métabolisme des crassulacée. Variation de l'acidité foliaire, genèse des acides organiques par bêta-carboxylation (Bull. Soc. fr. Physiol. Végét., 3, 1-11).
- 122 - Mac MULLEN A.I., 1960
Thiols of low molecular weight in *Hevea Brasiliensis* latex (Biochem. and Biophys. Acta, 41, 341-343).
- 123 - Mac MULLEN A.I., 1960
Nucleotides of *Hevea Brasiliensis* latex: The pyrophosphate components (Biochem. and Biophys. Acta, 41, 152-154).
- 124 - Mac MULLEN A.I., 1959
Ribonucléotides components (Biochem. J., 72, 545-549).
- 125 - Mac MULLEN A.I., 1961
A Helical polynucleotide template Hypothesis for the Biogenesis of Rubber (Biochem. J., 78, n° 3, 33-34).
- 126 - Mac MULLEN A.I., 1962
Polynucleotide Polyisoprene Particles (Biochem. J., 84-1, 30).
- 127 - Mac MULLEN A.I., 1962
Particulate Ribonucleoprotein components of *Hevea Brasiliensis* latex (Biochem. J., 85, 491-495).
- 128 - NATELSON S., PINCUS J.B., LUGOVOY J.K., 1948
Microestimation of citric acid, a new colorimetric reaction for pentabromoacetone (J. Biol. Chem., 175, 745-750).
- 129 - Natural Rubber Research Producer's Association, 1963-1964. Résultats non publiés.
- 130 - NITSCHKE E., 1952
(Mitt Lobensonmittel untersuch (Schweiz) 43, 50, cité par J. WOLF unter Anoschluez chromatographischer methods, Modern method of Plant Analysis de K PAECH et M.V. TRACEM II p. 478-538, Springer verlag, Berlin, 1955).
- 131 - OCHOA, 1952
(The Enzymes II, Part 2, p. 920, Acad. Press N.Y.)
- 132 - OSBURN G.L., WERKMAN G.H., 1932
Determination of carbon in fermented liquors (Ind. Eng. Chem. Anal. Edit, 4, 421-423).
- 133 - PALMER J.K., 1935
Determination of organic acids by Ion Exchange chromatography (The Connecticut Agricult. Experiment Station New Haven Bulletin 589, 3-31).
- 134 - PARK R.B., BONNER J., 1958
The Enzymatic synthesis of rubber from mevalonic acid (J. Biol. Chem., 233, 340).

- 135 - PETERS R.A., 1957
Mecanism of the toxicity of the active constituent of "Dichapclatum cymosum"
and related compounds (Adv. Enzym., 18, 113-159).
- 136 - PHARES E.F., LONG M.V., 1955
The complete degradation of Carbon 14 labeled succinic acid and succinic
anhydride by the Schmidt reaction (J. Amer. Chem. Soc., 77, 2556-2557).
- 137 - PHILPOTT M.W., SEKAR K.C., 1951
Determination of volatile fatty acids in latex (J. Rubb. Res. Inst. Malaya,
13, 164-165).
- 138 - PHILPOTT M.W., SEKAR K.C., 1953
Determination of volatile fatty acids in latex (J. Rubb. Res. Inst. Malaya,
14, 93-107, Comm. 281).
- 139 - PHILPOTT M.W., WESTGARTH D.R., 1953
Stability and mineral composition of hevea latex (J. Rubb. Res. Inst. Malaya,
14, 133-148).
- 140 - POLINIERE J-P., 1963
Modes d'expression des déséquilibres minéraux chez l'hévéa et observation
sur leurs traitements (Rev. Gén. Caout., 40, 1329-1338).
- 141 - POLINIERE J-P., 1963
Commission Technique 11 Juin 1963, Inst. Rech. Caout. Vietnam
- 142 - PUJARNISCLE S., d'AUZAC J., 1963
Sur quelques méthodes d'analyses biochimiques en usage à l'I.R.C.V. (Inst.
Rech. Caout. Vietnam: Op. Tech. N° 60/63)
- 143 - PUJARNISCLE S., 1964
Communication privée
- 144 - QUASTEL J.H., WOOLDRIGE W.R., 1928
Some properties of the deshydrogenating enzyme of bacteria (Biochem. J.,
22, 689-702).
- 145 - RABINOWITZ J.L., TEAS H.J., 1960
Biosynthesis of rubber from C¹⁴ Acetate by stem slices and latex enzyme
from hevea (Proceed. Nat. Rub. Res. Conf., Kuala-Lumpur, 777-786).
- 146 - RANSON S.L., 1955
Non volatile mono-, di- and tri-carboxylic acids (Modern Methods of Plant
Analysis, PAECH K., TRACEY M.Y., 539-582, Springer verlag, Berlin).
- 147 - RESING W.L., 1955
Thèse: Variability of hevea latex (Communication J.P.P.K. (Ex. INIRO)
n° 104).
- 148 - RIBAILLIER D., TUONG CHI CUONG ET FOURNIER P., 1964
Influence de la régénération du triphosphopyridine nucléotide (TPN) réduit
sur la formation du cis-polyisoprène dans le latex d'Hevea brasiliensis (C.R.
Acad. Sci. 258, 2118-2120)
- 149 - ROBBIE W., 1948
Use of cyanide in tissue respiration studies (Methods in Medical Research,
vol. I, 307-315, Year book Publisher Chicago).
- 150 - ROBERTS R.B., ROBERTS I.Z., 1950
Potassium metabolism in Escherichia Coli. III Inter-relationship of potassium
and phosphorus metabolism (J. Cellular Congr. Physiol., 36. 15).

- 151 - ROE C.P., EWART R.H., 1942
An Electrophoretic Study of the Proteins in Rubber Latex Serum (J. Amer. Chem. Soc., **64**, 2628-2632).
- 152 - ROPP G.A., RAAEN V.F., 1952
A comparison of the magnitudes of the isotope inter-molecular effects in the decarboxylations of malonic 1-¹⁴C acid and malonic 2-¹⁴C acid at 150° (J. Amer. Chem. Soc., **74**, 4992-4994).
- 153 - RUBB. RES. INST. MALAYA, 1954
- Ann. Report, p. 63
- 154 - id 1955 - Ann. Report, p. 52
- 155 - id 1961 - Ann. Report, p. 91
- 156 - RUFFO A., 1961
Un nouveau régulateur de la respiration des tissus animaux: l'acide glyoxylique (Bull. Soc. Chim. Biol., **43**, 701-725).
- 157 - SAVILLE B., 1958
(Analyst, **83**, 670).
- 158 - SCHOON TH.G.F., PHOA K.L., 1956
Morphology of the rubber particles in natural latices (Archief voor Rubbercult., **33**, 195-216).
- 159 - SEAMAN G.R., 1957
Preparation and properties of the succinate cleaving enzyme (J. Biol. Chem., **228**, 149-161).
- 160 - SEAMAN G.R., NASCHKE M.D., 1955
Reversible cleavage of succinate by extracts of tetrahymena (J. Biol. Chem., **217**, 1-12).
- 161 - SHIMAZONO H., HAYAISHI O., 1957
Enzymatic decarboxylation of oxalic acid (J. Biol. Chem., **227**, 151-159).
- 162 - SMITH R.H., 1954
The phosphatides of the latex of Hevea Brasiliensis (Biochem. J., **57**, 130-139, 140-144).
- 163 - SOUTHORN W.A., 1960
Complex particles in hevea latex (Nature, London, **188**, 165-166)
- 164 - SOUTHORN W.A., 1960
Microscopy of hevea latex (Proceed. Nat. Rubb. Res. Conf. Kuala-Lumpur, 766-776).
- 165 - SPIES J.R., 1952
An ultra-violet spectrophotometric micro-method for studying protein hydrolysis (J. Biol. Chem., **195**, 65-74).
- 166 - STANNARD J.N., HORECKER B.L., 1948
The in vitro inhibition of cytochrome oxydase by acid cyanide (J. Biol. Chem., **172**, 599-608).
- 167 - STENLID G., 1940
(Physiol. Plantarum, **2**, 350).
- 168 - TAKAMURA A., 1953
(J. Biol. Chem. Tokyo, **40**, 415).
- 169 - TAYSUM D.H., 1957
A simple apparatus for the collection of hevea latex under aseptic conditions (J. of Appl. Bact., **20**, 188-194).

- 170 - TAYSUM D.H., 1958
A possible basis for phyto-immunity (Nature, London, **181**, 174).
- 171 - TAYSUM D.H., 1963
Communication privée (Rubb. Res. Inst. Malaya, Division of Microbiology).
- 172 - TAYSUM D.H., 1960
The establishment of a bacterial population of latex vessels during normal tapping (Proceed. Nat. Rubb. Res. Conf. Kuala-Lumpur, 858-871).
- 173 - TEAS E.H., BANDURSKI R.S., 1956
The enzymatic synthesis of rubber (J. Amer. Chem. Soc., **78**, 3549).
- 174 - Van den TEMPEL M., 1954
Formation of acidic constituents in ammoniated hevea latex (Arch. of Rubb. Cult., **31**, 209-232).
- 175 - (NG) TET-SOEI, 1960
Isolation and identification of the free amino acids in fresh unammoniated hevea latex (Proceed. Nat. Rubb. Res. Conf. Kuala-Lumpur, 809-821).
- 176 - THOMAS M., 1949
Physiological studies on acid metabolism in green plant. I. CO₂ fixation and CO₂ liberation in crassulacean acid metabolism (New Physiologist, **48**, 390-420).
- 177 - THUNBERG T., 1920
(Skand Arch. Physiol., **40**, 1).
- 178 - TOLBERT N.E., CLAGETT C.O., BURRIS R.H., 1949
J. Biol. Chem., **181**, 905-914).
- 179 - TOPPER Y.T., STETTEN P., 1954
Formation of "Acetyl" from succinate by rabbit liver slices (J. Biol. Chem., **209** (1), 63-71).
- 180 - TURNER J.S., HANLEY V.F., 1949
Succinate and plant respiration (New Phytologist, **48**, 149).
- 181 - UMBREIT W.W., BURRIS R.H., STAUFFER J.F., 1957
Manometric Technique. Burgess publishing Minneapolis
- 182 - UTTER M.F., 1958
Carbohydrate metabolism (Ann. Rev. Biochem., **27**, 245-284).
- 183 - VAGELOS J., 1960
Propionic acid metabolism. IV. Synthesis of Malonyl Coenzyme A (J. Biol. Chem., **235**, 346-350).
- 184 - VENNESLAND B., 1944
(J. Biol. Chem., **156**, 783)
- 185 - de VRIES O., 1917
Partial coagulation of latex (Archief voor Rubbercult., **1**, 185-187).
- 186 - WAKIL S.J., 1958
Malonic acid derivative as a intermediate in fatty acids synthesis (J. Amer. Chem. Soc., **80**, 6465).
- 187 - WAKIL S.J., 1961
Enzymatic synthesis of fatty acids (VI^e Congres Intern. de Biochimie Moscou, Août 1961, Symposium n° VIII).
- 188 - WARBURG O., 1926
über die wirkung des Kohlenoxyds auf den stoffwechsel der hefe (Biochem. Z., **177**, 471-486).

- 189 - WARBURG O., CHRISTIAN W., 1942
Isolierung und kristallisation des Gärungsferments enolase (Biochem. Z., 310, 384-421).
- 190 - WERKMAN C.H., 1960
The formic fermentation (Encyclop. of Plant Physiol. Springer verlag, Berlin, XII/ 1, p. 1062-1073).
- 191 - WHITBY G.S., 1962
The Biogenesis of rubber: How the tree makes rubber (Inst. Rubb. Ind. Trans. and Proceed., 38-4, T116-T153).
- 192 - WHITBY G.S., 1919
(Ann. Bot. 31, 313)
- 193 - WIELAND H., SONDERHOFF R., 1932
Die enzymatische oxydation von Essigsäure durch Hefe (Ann. Deutsch. Chem. Gesell., 499, 213-228).
- 194 - WIELAND H., 1922
(Ergeb. Physiol., 20, 477).
- 195 - WIGGINS L.F., WILLIAMS J.H., 1955
Amino acids content of west indies sugar cane (Agricult. and food Chemistry, 3, 341-345).
- 196 - WINTERS J.C., KUNIN R., 1949
Ion exchange in the pharmaceutical field (Ind. Eng. Chem., 41, 460-463).
- 197 - WOLF J., 1960
Der diurnale Säuerhythmus (Encyclop. of Plant Physiol. Springer verlag, Berlin, XII/ 2, p. 809-889).
- 198 - WONG D.T.O., AJL S.J., 1956
Conversion of acetate and glyoxylate to malate (J. Amer. Chem. Soc., 78, 3230-3231).



DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté :

**SUR QUELQUES RELATIONS ENTRE LA COMPOSITION, L'ACTIVITE
BIOCHIMIQUE DU LATEX ET LA PRODUCTIVITE DE L'HEVEA
BRASILIENSIS**

Vu et approuvé :

Paris, le 30 Juin 1965

**Le Doyen de la Faculté des Sciences,
Marc. ZAMANSKY**

Vu

et Permis d'imprimer

**Le Recteur de l'Académie
de Paris,
Jean ROCHE**

